

**KUALITAS DAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI SETELAH SEXING DENGAN  
GRADIEN ALBUMIN (PUTIH TELUR) MENGGUNAKAN PENGECER  
ANDROMED DAN CEP-2 DITAMBAH KUNING TELUR 10%**

**TESIS**

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains dalam bidang biologi**

**oleh**

**RITA FITRIA PURWOISTRI**

**106090101011007**



**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2012**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**KUALITAS DAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI SETELAH SEXING DENGAN  
GRADIEN ALBUMIN (PUTIH TELUR) MENGGUNAKAN PENGENCER  
ANDROMED DAN CEP-2 DITAMBAH KUNING TELUR 10%**

**oleh**

**RITA FITRIA PURWOISTRI**

**106090101011007**

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji  
pada tanggal 7 Desember 2012  
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar  
Magister Sains dalam bidang biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Prof. Dr. Trinil Susilawati, MS.

1962111 2198701 2 001

Dr. Sri Rahayu, M.Kes.

19620528 198701 2 001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Magister Biologi  
Universitas Brawijaya

Dra. Tri Ardyati, M.Agr., Ph.D.

1967121 3199103 2 001

## PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rita Fitria Purwoistri

NIM : 106090101011007

Jurusan : Biologi

Penulis tesis berjudul:

Kualitas dan Membran Spermatozoa Sapi Setelah Sexing dengan gradien Albumin (Putih Telur)  
Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari tesis yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan bukan plagiat karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tesis ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tesis yang saya tulis terbukti hasil plagiat, maka saya akan bersedia menanggung segala risiko.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan penuh kesadaran.

Malang, 7 Desember 2012

Yang menyatakan



(Rita Fitria Purwoistri)

106090101011007

## **PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS**

Tesis ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada pengarang. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

**KUALITAS DAN MEMBRAN SPERMATOZOA SAPI SETELAH SEXING DENGAN  
GRADIEN ALBUMIN (PUTIH TELUR) MENGGUNAKAN PENGECER  
ANDROMED DAN CEP-2 DITAMBAH KUNING TELUR 10%**

Rita Fitria Purwoistri<sup>1</sup>, Trinil Susilawati<sup>2</sup>, Sri Rahayu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengentahuan Alam,

<sup>2</sup>Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya Malang

**ABSTRAK**

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kualitas dan membran spermatozoa setelah sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan *Cauda Epididymal Plasma 2* (CEP-2) ditambah kuning telur 10%. Pengamatan kualitas spermatozoa meliputi motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi dan total spermatozoa motil. Sedangkan pengamatan membran spermatozoa meliputi spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, belum kapasitas, kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa. Pengamatan integritas membran menggunakan HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*), pengamatan kapasitas dan reaksi akrosom spermatozoa menggunakan pewarna fluoresen CTC (*Chlortetracycline*). Hasil penelitian menunjukkan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga penurunan kualitas spermatozoa. Motilitas, viabilitas, konsentrasi dan total spermatozoa motil dijaga tetap tinggi, sedangkan abnormalitas dijaga tetap rendah. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat melindungi membran spermatozoa. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mengurangi penurunan spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa belum kapasitas, sedangkan kapasitas dan reaksi akrosom dijaga tetap rendah. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga kualitas dan membran spermatozoa lebih baik daripada pengencer andromed.

Kata kunci :andromed, CEP-2, gradien albumin, membran spermatozoa, sexing

# **QUALITU AND MEMBRANE OF SPERM FOLLOWING GRADIENT ALBUMIN SEXING USING ANDROMED AND CEP-2 SUPPLEMENTED WITH 10% EGG YOLK**

Rita Fitria Purwoistri<sup>1</sup>, Trinil Susilawati<sup>2</sup>, Sri Rahayu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biology Department, Mathematics and Natural Science Faculty, Brawijaya University, Malang

<sup>2</sup>Animal Husbandry Faculty, Brawijaya University, Malang

## **ABSTRACT**

*The objective of this study was to determine the quality and membrane of sperm after sexing with gradient albumin (egg white) using andromed and Cauda Epididymal Plasma 2 (CEP-2) supplemented with 10% egg yolk. The observations of sperm quality included motility, viability, abnormality, concentration, and total motile sperm. Whereas observations of sperm membrane included membrane integrity, uncapacitated, capacitated and acrosome reacted. Albumin gradient was made by mixing egg white with andromed or CEP-2 supplemented with 10% egg yolk resulting in a concentration of egg whites 10%, 30%, and 50%. Membrane integrity was observed using HOST (Hypoosmotic Swelling Test), while uncapacitated, capacitated and acrosome reacted sperm were observed using CTC (Chlortetracycline) staining. The results showed that andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk could reduce the decline in sperm quality. Motility, viability, concentration and total motile sperm could be kept high, whereas abnormality could be kept low. Andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk could protect sperm membrane. Andromed and CEP-2 supplemented with 10% egg yolk could protect membrane integrity, uncapacitated, capacitated and acrosome reacted sperm. Andromed and CEP-2 supplement with 10% egg yolk could reduce the damage of membrane integrity and uncapacitated sperm, whereas capacitated and acrosome reacted sperm could be kept low. CEP-2 supplemented with 10% egg yolk keep the quality and membrane of sperm is good more than diluter andromed.*

*Keywords: albumin gradient, andromed, CEP-2, sperm membrane, sexing*

## KATA PEGANTAR



*Assalamu 'alaikum Warrohmatullohi Wabarokatuh*

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyajikan tulisan tesis yang berjudul : Kualitas dan Membran Spermatozoa Sapi Setelah Sexing dengan Gradien Albumin (Putih Telur) Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%. Penulis menyadari bahwa banyak pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penulisan tesis ini. Untuk itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. **Prof. Dr. Trinil Susilawati, MS** selaku Ketua Pembimbing dan Ketua Tim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi yang dengan tulus, ikhlas dan sabar bersedia meluangkan waktu, tenaga, pikiran dan perhatian dalam memberikan bimbingan dan arahan mulai dari penyusunan proposal sampai dengan penyusunan tesis ini.
2. **Dr. Sri Rahayu, M.Kes.** selaku Anggota Pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk membimbing, mengarahkan dan memberikan motivasi dalam menyelesaikan tesis ini.
3. **Dr. Agung Pramana W.M., M.S.** selaku Penguji I yang telah menguji dan memberikan saran serta arahan dalam penyusunan tesis ini.
4. **Dr. Sri Widyarti, M.Si** selaku Penguji II yang telah menguji dan memberikan saran serta arahan dalam penyusunan tesis ini.
5. **Ayahanda Tarmisan, Ibunda Masriah, Adek Fitra dan Segenap Keluarga** yang telah memberikan kasih sayang, pengorbanan, kesabaran serta do'anya yang tiada henti sejak penulis lahir hingga kini dewasa, semoga karya ini menjadi kado yang mampu mengukir senyum manis di wajah Ayah dan Ibu.
6. **Zumrotul Mufidah, S.Si., Nurul Hidayati, S.Si., Mohammad Hefni, S.Si., Akhmad Fathir, S.Si.** terimakasih atas persahabatan dan semangatnya.
7. **Tim Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi:** Aplikasi teknologi Terpadu dan Intervensi Masyarakat dalam Rangka Penguatan Sistem Industri Sapi Potong Berbasis Lokal. **Achadiyah Rachmawati, S.Pt. M.Si., Setyawati, S.Si.,** yang telah memerikan ilmu dan membantu penulis dalam penelitian dan penyusunan tesis. **Yudha Fika Diliyana, S.Si, Fatahillah, Aria Mahendra Putra, Moh. Erwandi, S.Pt, Juniandri, S.Pt, Indriani, S.Pt, Ardhiba Firdausi, S.Pt, Arief Noviandi, Iis Puspitasari,** dan anggota lain yang telah membantu dan bekerjasama sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian.
8. **Ibnu Rusdy dan Yeni Hasfita** yang telah memberikan semangat dan dukungan selama penulis menempuh pendidikan Program Studi Biologi S1 dan S2.
9. **Segenap Dosen dan Karyawan Program Pascasarjana Jurusan Biologi** yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan pendidikan di Universitas Brawijaya.
10. Semua pihak yang terlibat dalam penyelesaian tesisi ini yang tidak bisa penulis sebutkan.

Semoga Allah SWT memberikan pahala atas segala kebaikan yang telah diberikan kepada saya. Semoga tesis ini bermanfaat untuk penulis dan semua pihak yang berkepentingan serta menambah khasanah ilmu pengetahuan dan merupakan amal bakti dalam mencapai ridho Allah SWT semata.

*Wassalamu 'alaikum Warrohmatullohi Wabarokatuh*

Malang, 7 Desember 2012

Penulis

## DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN .....	i
PERNYATAAN ORISINALITAS TESIS .....	ii
PEDOMAN PENGGUNAAN TESIS .....	iii
ABSTRAK.....	iv
ABSTRACT.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN .....	xii
 <b>I. PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
 <b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Spermatozoa Sapi.....	4
2.2 Membran Spermatozoa.....	5
2.3 Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Gradien Albumin (Putih Telur).....	8
2.4 Pengencer Adromed .....	10
2.5 Pengencer <i>Cauda Epididymal Plasma 2</i> (CEP-2).....	11
 <b>III. KERANGKA KONSEP PENELITIAN</b>	
3.1 Kerangka Pikir .....	13
3.2 Hipotesis .....	15
3.3 Definisi Operasional .....	15
 <b>IV. METODE PENELITIAN</b>	
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	17
4.2 Prosedur Penelitian .....	17
4.3 Variabel Penelitian.....	21
4.4 Analisa Data.....	21
4.5 Kerangka Operasional .....	22
 <b>V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>	
5.1 Kualitas Semen Segar.....	23
5.2 Kualitas Spermatozoa Setelah Sexing dengan Gradien Albumin (Putih Telur) Menggunakan Pengencer Andromed dan pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% .....	25
5.3 Membran Spermatozoa Setelah Sexing dengan Gradien Albumin (Putih Telur) Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% .....	34
5.4 Korelasi Antara Persentase Motilitas dengan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah .....	42



<b>VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b>	
6.1 Kesimpulan.....	46
6.2 Saran.....	46
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>47</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>53</b>

## DAFTAR TABEL

Nomor Tabel	Judul Tabel	Halaman
4.1	Perbandingan Konsentrasi Putih Telur dengan Andromed .....	18
4.2	Perbandingan Konsentrasi Putih Telur dengan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%.....	18
5.3	Hasil Pemeriksaan Semen Segar .....	23
5.4	Rata-Rata Persentase Motilitas Spermatozoa Sesudah Sexing .....	25
5.5	Rata-Rata Persentase Viabilitas Spermatozoa Sesudah Sexing .....	27
5.6	Rata-Rata Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Sexing .....	29
5.7	Rata-Rata Konsentrasi Spermatozoa Sesudah Sexing.....	31
5.8	Rata-Rata Total Spermatozoa Motil Sesudah Sexing .....	32
5.9	Rata-Rata Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Sesudah Sexing.	34
5.10	Rata-Rata Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi Sesudah Sexing.....	37
5.11	Rata-Rata Persentase Kapasitasi Spermatozoa Sesudah Sexing.....	38
5.12	Rata-Rata Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Sesudah Sexing .....	40

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Spermatozoa Mamalia.....	4
2.2	Penampang Melintang Struktur Membran Plasma .....	5
2.3	Mekanisme Reaksi Akrosom Sebagai Respon Terhadap Zona Protein 3 (ZP3) .....	6
2.4	Hasil Pengamatan Spermatozoa Menggunakan CTC ( <i>Chlortetracycline</i> ) .....	8
3.5	Diagram Alir Kerangka Pikir .....	13
4.6	Diagram Alir Kerangka Operasional Penelitian .....	22
5.7	Rata-Rata Persentase Motilitas Spermatozoa Sesudah Sexing .....	25
5.8	Hasil Pengamatan Viabilitas Spermatozoa .....	27
5.9	Rata-Rata Persentase Viabilitas Spermatozoa Sesudah Sexing.....	27
5.10	Hasil Pengamatan Abnormalitas Spermatozoa .....	29
5.11	Rata-Rata Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Sexing.....	29
5.12	Rata-Rata Konsentrasi Spermatozoa Sesudah Sexing .....	31
5.13	Rata-Rata Total Spermatozoa Motil Sesudah Sexing .....	33
5.14	Hasil Pengamatan Membran Spermatozoa Menggunakan HOST ( <i>Hypoosmotic Swelling Test</i> ).....	34
5.15	Rata-Rata Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Sesudah Sexing.....	35
5.16	Rata-Rata Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi Sesudah Sexing .....	37
5.17	Rata-Rata Persentase Kapasitasi Spermatozoa Sesudah Sexing.....	39
5.18	Rata-Rata Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Sesudah Sexing.....	40
5.19	Korelasi Antara Persentase Motilitas dengan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah .....	43

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1.	Persiapan Reagen dan Cara Membuat Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%.....	53
2.	Prosedur Pemisahan Spermatozoa X dan Y Menggunakan Albumin Putih Telur.....	54
3.	Persiapan Reagen untuk Mengamati Kapasitas Spermatozoa Menggunakan CTC.....	55
4.	Uji T Berpasangan Persentase Motilitas Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	56
5.	Uji T Berpasangan Persentase Viabilitas Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	60
6.	Uji T Berpasangan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	65
7.	Uji T Berpasangan Konsentrasi Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	70
8.	Uji T Berpasangan Total Spermatozoa Motil Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	74
9.	Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur).....	78
10.	Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitas Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	81
11.	Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Kapasitas Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	84
12.	Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Reaksi Akrosom Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur) .....	87
13.	Hasil Analisa Regresi Korelasi Antara Persentase Motilitas dengan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitas pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah.....	90

## DAFTAR LAMBANG DAN SINGKATAN

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Keterangan</u>
AC	adenil cyclase
ATP	adenosine triphosphate
BBIB	balai besar inseminasi buatan
BO	brackett-oliphant
BSA	bovine serum albumin
BSP	bovine seminal plasma
cAMP	cyclic adenosine mono phosphate
CEP-2	cauda epididymal plasma
CTC	chlortetracycline
DAG	diacylglycerol
DF	decapacitation factor
DNA	deoxyribonucleic acid
GPC	glyceryl phosphoryl choline
HDL	hight density lipoptotein
HOST	hypoosmotic swelling test
IB	inseminasi buatan
IM	integritas membran
IP <sub>3</sub>	inositol 1',4',5'- trisphosphate
LDL	low density lipoprotein
MDA	malonaldehid
PIP <sub>2</sub>	phosphatidilinositol 4',5'-biphosphate
PKA	protein kinase A
PKC	protein kinase C
PLC	phospholipase C
PTM	post thawing motility
RA	reaksi akrosom
ROS	reactive oxygen species
SOD	super oxide dismutase
SNI	standar nasional indonesia
SRY	sex determining region Y gene
TK	tirosin kinase
ZP3	zona protein 3
ZRK	zona reseptor kinase

<u>Simbol/Singkatan</u>	<u>Nama Unit</u>
%	persen
<	lebih kecil dar
>	lebih besar dari
±	standar deviasi
°C	derajat celcius
10 <sup>6</sup>	juta
g	gram
ml	mili liter
mOsm	miliosmol
β	beta
μm	mikro meter

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bioteknologi reproduksi saat ini berkembang dengan pesat dan berperan sebagai usaha meningkatkan kualitas hasil reproduksi. Sexing merupakan salah satu contoh bioteknologi reproduksi. Pemanfaatan teknologi sexing atau pemisahan spermatozoa X dan Y merupakan pilihan tepat untuk mendukung peran Inseminasi Buatan (IB) dalam rangka meningkatkan efisiensi usaha peternakan. Keberhasilan sexing spermatozoa X dan Y dapat menghasilkan pedet dengan jenis kelamin yang diharapkan (Sujoko dkk., 2009).

Macam-macam metode sexing yang telah dilakukan antara lain metode sedimentasi, *albumin column*, sentrifugasi gradient densitas *percoll*, *elektroforesis*, *H-Y antigen*, *flow cytometri* dan *filtrasi* dengan *sephadex column*. Metode sexing yang mudah untuk diterapkan dan diaplikasikan, yaitu separasi dengan albumin (Hafez dan Hafez, 2000). Sianturi dkk. (2007) melaporkan, sexing menggunakan albumin putih telur dapat memisahkan spermatozoa X 75,2–78,2% dan spermatozoa Y 82–87,5%. Sexing dengan albumin putih telur dapat mempertahankan dan mengurangi penurunan kualitas spermatozoa selama proses sexing (Saili dkk., 2000). Putih telur mengandung bermacam-macam protein, anti bakteri, vitamin, mineral dan karbohidrat (Belitz dkk., 2009) sehingga mampu melindungi dan menyediakan energi bagi spermatozoa.

Sentrifugasi terhadap spermatozoa saat pencucian ketika proses sexing menyebabkan penurunan motilitas dan spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh (Afiati, 2004; Saili dkk., 2000). Sentrifugasi menyebabkan gesekan antar spermatozoa dan antara spermatozoa dengan medium pencuci, sehingga menyebabkan perubahan struktur membran spermatozoa. Sentrifugasi juga menyebabkan terpisahnya spermatozoa dari seminal plasma yang mengakibatkan peningkatan pembentukan *reactive oxygen species* (ROS) (Susilawati, 2005; Ollero dkk., 2001). Oleh karena itu, sexing dengan gradien albumin (putih telur) membutuhkan pengencer yang dapat melindungi membran spermatozoa agar kualitas spermatozoa hasil sexing dapat dipertahankan tetap baik (Susilawati dkk., 2002).

Pengencer yang sering digunakan untuk sexing antara lain andromed (Mubarakati, 2009; Udrayana, 2009) dan tris aminomethan kuning telur (Susilawati dkk., 2002; Susilawati, 2002; Pratiwi dkk., 2006). Andromed merupakan pengencer untuk semen beku dan cair. Andromed mengandung lesitin nabati dan tidak menggunakan protein asal hewan (Setiadi dkk., 2006). Lesitin nabati dari ekstrak kacang kedelai berperan melindungi membran plasma spermatozoa (Aires dkk., 2003). Pengencer andromed selama ini digunakan sebagai pengencer semen beku

(Herold dkk., 2004), sexing dengan sentrifugasi gradien densitas percoll (Mubarakati, 2009) dan sexing dengan gradien albumin BSA (*bovine serum albumin*) (Udrayana, 2009). Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian penggunaan andromed sebagai pengencer dalam proses sexing dengan gradien albumin (putih telur).

Saat ini sedang dikembangkan pengencer *Cauda Epididymal Plasma 2* (CEP-2). Pengencer CEP-2 memiliki komposisi KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> dan sorbitol. Komposisi tersebut sama seperti komposisi pengencer Tris aminomethan (Verberckmoes dkk., 2004). Pengencer CEP-2 mengandung BSA yang merupakan komponen makromolekul, berperan mengikat Ca<sup>2+</sup>, mencegah masuknya Ca<sup>2+</sup> yang berlebihan ke dalam spermatozoa, sehingga konsentrasi Ca<sup>2+</sup> intaseluler dapat dipertahankan dalam kondisi normal agar tidak toksik terhadap spermatozoa (Landim-Alvarenga dkk., 2004). Penambahan kuning telur 10% pada pengencer CEP-2 terbukti dapat memperpanjang masa penyimpanan spermatozoa sapi pada suhu 5°C selama 6 hari, dengan persentase motilitas sebesar 48% (Verberckmoes dkk., 2004). Berdasarkan hasil penelitian tersebut, maka dalam penelitian ini dilakukan penambahan kuning telur 10% pada pengencer CEP-2. Kuning telur mengandung sumber nutrisi, lipoprotein dan lesitin, sehingga mampu menyediakan sumber energi, melindungi dan mempertahankan integritas membran spermatozoa (Susilawati, 2002). Kuning telur membantu mencegah hipermotilitas dan kapasitasi dini spermatozoa (Delgado dkk., 2009). Penambahan kuning telur pada pengencer CEP-2 mampu melindungi spermatozoa terhadap ROS, melindungi integritas dan mempertahankan keutuhan ultrastruktur membran spermatozoa (Ducha, 2012). Aplikasi CEP-2 ditambah kuning telur selama ini sebagai pengencer dalam proses pembuatan semen cair (Verberckmoes dkk., 2004; Ducha, 2012). Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian penggunaan CEP-2 ditambah 10% kuning telur sebagai pengencer dalam proses sexing dengan gradien albumin (putih telur).

Penggunaan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% diharapkan dapat melindungi membran spermatozoa ketika proses sexing, sehingga perubahan dan kerusakan membran serta perubahan regulasi ion dapat diminimalisir. Dengan demikian kualitas spermatozoa dapat dipertahankan tetap baik dengan membran yang dapat berfungsi baik. Analisa membran spermatozoa dapat dilakukan melalui pengamatan integritas membran, spermatozoa belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom. Harga pengencer andromed relatif mahal dan merupakan produk impor, sehingga diperlukan usaha mencari pengencer alternatif. Pengencer alternatif diharapkan lebih menguntungkan daripada pengencer andromed, yaitu dengan harga relatif murah, mudah diperoleh dan dapat menjaga kualitas spermatozoa.

Berdasarkan uraian di atas, maka dalam penelitian ini dilaksanakan kajian untuk mengetahui kualitas dan membran spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

## **1.2 Perumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah pengaruh sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% terhadap kualitas dan membran spermatozoa?
2. Pengencer manakah yang terbaik diantara andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% yang dalam menjaga kualitas dan membran spermatozoa setelah sexing dengan gradien albumin (putih telur)?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui pengaruh sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer Andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% terhadap kualitas dan membran spermatozoa.
2. Untuk mengetahui pengencer terbaik diantara andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% yang dapat menjaga kualitas dan membran spermatozoa setelah sexing dengan gradien albumin (putih telur).

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1. Manfaat Ilmiah**

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi peran andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam melindungi spermatozoa, sehingga kualitas dan membran spermatozoa hasil sexing dapat dijaga tetap baik.

### **1.4.2 Manfaat Praktis**

Pengencer terbaik hasil analisa dari penelitian ini diharapkan dapat digunakan sebagai bahan rujukan dalam penggunaan dan pengembangan teknologi sexing spermatozoa untuk aplikasi bioteknologi reproduksi.

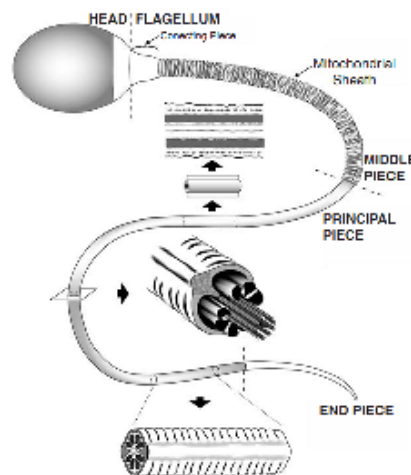


## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Spermatozoa Sapi

Spermatozoa merupakan produk akhir dari proses spermatogenesis pada hewan jantan, dibentuk dalam tubulus seminiferus di dalam testis. Tubulus seminiferus berisi rangkaian sel benih yang berkembang dan pembelahan yang akhirnya membentuk spermatozoa (Garner dan Hafez, 2008). Spermatozoa yang diproduksi di dalam tubulus seminiferus mengalami pematangan dan disimpan di dalam epididimis, sampai diejakulasikan bersama dengan seminal plasma (Eddy, 2006). Bentuk spermatozoa yang sempurna adalah sel memanjang yang terdiri atas kepala dan ekor. Seluruh bagian spermatozoa dilapisi oleh plasmalemma atau membran plasma (Garner dan Hafez, 2008). Gambar spermatozoa seperti pada Gambar 1.



Gambar 2.1 Spermatozoa Mamalia (Eddy, 2006)

Kepala spermatozoa mengandung nukleus, struktur sitoskeletal dan sejumlah kecil sitoplasma. Nukleus mengandung kromatin yang memadat dan bagian anterior ditutupi oleh akrosom, yaitu vesikel sitoplasmik yang mendung enzim hidrolitik yang dilapisi oleh struktur membran rangkap yang terletak diantara membran plasma dan bagian anterior kepala spermatozoa. Akrosom memiliki bagian *anterior acrosome*, *equatorial segment* dan *postacrosomal region*. Leher (*connecting piece*) menghubungkan bagian kepala dengan ekor (*flagellum*) spermatozoa. Bagian ekor terdiri dari bagian tengah (*middle piece*), pokok (*principal piece*) dan akhir (*end piece*) (Eddy, 2006).

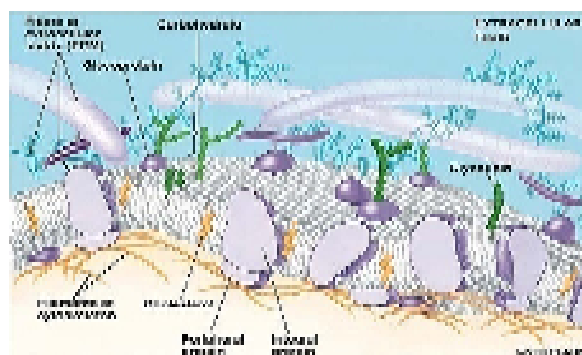
Mamalia jantan bersifat heterogametik, satu bagian spermatozoa mengandung kromosom X dan bagian yang lain mengandung kromosom Y. Pada kromosom Y terdapat *sex determining region Y gene (SRY)* yang menentukan terbentuknya testis pada hewan jantan. Oleh karena itu, ketika memfertilisasi oosit spermatozoa yang membawa kromosom Y (spermatozoa Y)

menghasilkan embrio jantan, sedangkan spermatozoa yang membawa kromosom X (spermatozoa X) menghasilkan embrio betina (Garner dan Hafez, 2008).

Spermatozoa X memiliki kandungan DNA (*deoxyribonucleic acid*) yang lebih banyak, ukuran yang lebih besar dan motilitas yang lebih lambat daripada spermatozoa Y. Pada permukaan spermatozoa X tidak terdapat *HY antigen*, sedangkan pada permukaan spermatozoa Y terdapat *HY antigen* (Prasad dkk., 2010). Spermatozoa X mempunyai ketahanan hidup lebih tinggi dibandingkan spermatozoa Y (Susilawati, 2005). Spermatozoa X memiliki ukuran rata-rata panjang kepala 9,68  $\mu\text{m}$  dan rata-rata lebar kepala 5,44  $\mu\text{m}$  yang lebih besar dibanding dengan spermatozoa Y yaitu rata-rata panjang kepala 9,15  $\mu\text{m}$  dan rata-rata lebar kepala 5,14  $\mu\text{m}$  (Afiati, 2004).

## 2.2 Membran Spermatozoa

Secara umum struktur membran terdiri atas dua lapis fosfolipid, protein, glikoprotein dan karbohidrat dalam bentuk membran glikokaliks (Campbell dkk., 2002). Membran sel berfungsi melindungi organel-organel dan sel terhadap kerusakan mekanik, sebagai filter bagi pertukaran zat-zat intra dan ekstraseluler yang dipertahankan dalam proses metabolisme (Garner dan Hafez, 2008). Integritas membran merupakan keutuhan membran spermatozoa atau suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran tetap terjaga sebagai kontrol terhadap sistem transport (Esteves dkk., 2000). Keutuhan integritas membran spermatozoa terutama membran plasma mutlak diperlukan untuk menjamin kelangsungan hidup dan keberhasilannya dalam membuahi sel telur (Garner dan Hafez, 2008). Struktur membran sel seperti pada Gambar 2.2.



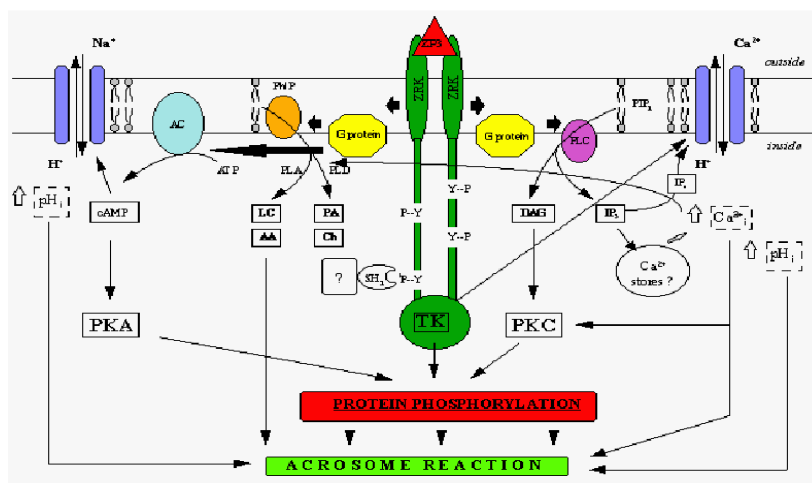
Gambar 2.2 Penampang Melintang Struktur Membran Plasma (Campbell dkk., 2002)

Fosfolipid merupakan lipid yang jumlahnya melimpah dalam membran, berperan sebagai pelindung utama dan membantu menstabilkan membran, karena kemampuan fosfolipid bersama kolesterol steroid (Campbell dkk., 2002) membentuk konformasi stabil serta menunjukkan struktur dasar membran biologis (Cooper dan Hausman, 2004). Diantara fosfolipid terdapat

protein globular dan fibrous yang bersifat dinamis dan dapat bergerak bebas diantara kedua lapisan fosfolipid. Protein membran berperan sebagai transport dan sinyal tansduksi. Bagian luar kedua lapisan fosfolipid terdapat karbohidrat, berupa oligosakarida yang secara kovalen berikatan dengan protein dan lipid yang masing-masing disebut glikoprotein dan glikolipid. Karbohidrat pada membran berperan sebagai penanda pengenalan sel dalam komunikasi seluler dan hubungan antar sel (Campbell dkk., 2002).

Pada saluran reproduksi betina, spermatozoa mengalami serangkaian perubahan intraseluler dan fisikokimia membran yang disebut kapasitasi yang membuat spermatozoa mampu untuk memfertilisasi sel telur (Patrat dkk., 2000). Spermatozoa yang menjalani proses kapasitasi mengalami perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid penyusun membran plasma. Kapasitasi terdiri dari sejumlah proses bertahap yang meliputi peningkatan ketidakstabilan membran akibat berkurangnya kolesterol, hiperpolarisasi membran plasma dan perubahan aliran ion yang mengakibatkan perubahan potensial membran, peningkatan pH dan konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  intaseluler, peningkatan fosforilasi protein tirosin, induksi hiperaktifitas motilitas dan reaksi akrosom (Felix dkk., 2004; Patrat dkk., 2000; Naz dan Rajesh, 2004).

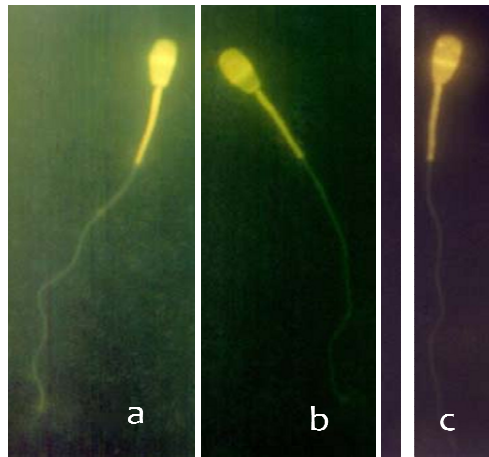
Spermatozoa setelah mengalami kapasitasi, dilanjutkan dengan terjadinya reaksi akrosom. Reaksi akrosom merupakan reaksi eksositosis yang tergantung pada ion  $\text{Ca}^{2+}$ , termasuk penggabungan antara membran plasma dengan *outer membrane* akrosom. Penggabungan membran ini menyebabkan terbukanya *inner membrane* akrosom yang mengandung protease dan glikosidase sehingga menyebabkan spermatozoa mampu melakukan penetrasi melalui zona pelusida untuk mencapai membran plasma oosit (Felix dkk., 2004; Landim-Alvarenga dkk., 2004). Mekanisme terjadinya reaksi akrosom sebagai respon terhadap adanya sinyal ZP3 (zona protein 3) seperti terlihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Mekanisme Reaksi Akrosom Sebagai Respon Terhadap Zona Protein 3 (ZP3) (Baldi dkk., 1996)

Secara alami, reaksi akrosom diinduksi oleh bertemunya reseptor membran spermatozoa dengan ZP3. ZP3 merupakan glikoprotein yang terdapat pada zona pellusida dan berfungsi sebagai reseptor utama spermatozoa (Fraser, 1998). Sinyal kimiawi ZP3 berikatan dengan ZRK (zona *reseptor* kinase), yaitu reseptor untuk ZP3 yang terikat dengan protein G (*Guanine nucleotide binding proteins*). Ikatan antara ZP3 dan ZRK menginduksi aktivasi tirosin kinase (TK) yang selanjutnya menginduksi dan meningkatkan fosforilasi protein. Interaksi antara ZP3 dan ZRK juga dapat mengaktifkan protein G, yang kemudian menstimulasi *phospholipase C* (PLC), sehingga menjadi aktif. PLC selanjutnya memecah fosfolipid membran plasma *phosphatidilinositol 4',5'-biphosphate* (PIP<sub>2</sub>) menjadi *diacylglycerol* (DAG) dan *inositol 1',4',5'- trisphosphate* (IP<sub>3</sub>). Kemudian IP<sub>3</sub> berdifusi melalui sitosol dan berikatan dengan reseptor saluran ion Ca<sup>2+</sup> pada membran plasma. Akibatnya saluran ion Ca<sup>2+</sup> terbuka, sehingga ion Ca<sup>2+</sup> dapat bergerak masuk menuju ke dalam sitoplasma. Arus masuk ion Ca<sup>2+</sup> akan menonaktifkan Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, sehingga konsentrasi Na<sup>+</sup> intraseluler meningkat dan K<sup>+</sup> menurun dan mengakibatkan arus keluar ion H<sup>+</sup> dari spermatozoa. Peningkatan Ca<sup>2+</sup> intraseluler bersamaan dengan keluarnya H<sup>+</sup> dari spermatozoa ditunjukkan dengan peningkatan pH intraseluler. DAG dan ion Ca<sup>2+</sup> berikatan dengan protein kinase C (PKC), sehingga PKC menjadi aktif. PKC yang aktif kemudian memfosforilasi protein-protein kinase lain melalui fosforilasi protein. Protein G dan Ca<sup>2+</sup> intraseluler juga terlibat dalam aktivasi AC (adenil siklase). AC yang aktif selanjutnya mengkatalis pembentukan ATP menjadi cAMP (*cyclic adenosine mono phosphate*). Aktivasi cAMP ini menyebabkan aktivasi protein kinase A (PKA) dan PKC yang terlibat dalam fosforilasi protein. Aktifnya cAMP juga menyebabkan masuknya Na<sup>+</sup> ke dalam spermatozoa dan keluarnya H<sup>+</sup> menuju luar spermatozoa (Baldi dkk., 1996). Ion Ca<sup>2+</sup> yang berpenetrasi pada membran plasma akan memicu penggabungan antara membran plasma pada bagian anterior dengan membran luar akrosom, sehingga vesikula akrosom mengalami eksositosis. Eksositosis vesikel akrosom berupa pelepasan bermacam-macam enzim protease (Florman dan Ducibella, 2006; Felix dkk., 2004).

Kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa dapat diamati menggunakan pewarna fluoresen antibiotik *chlortetracycline* (CTC). Hasil pewarnaan spermatozoa menggunakan pewarna CTC terdapat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Hasil Pengamatan Spermatozoa Menggunakan CTC (Susilawati, 2011)

Keterangan A : spermatozoa belum kapasitasasi,  
B : kapasitasasi spermatozoa  
C : reaksi akrosom spermatozoa

Menurut Kaul dkk. (2001) hasil pewarnaan CTC memperlihatkan 3 pola fluoresen yaitu (1) seluruh kepala berwarna terang, yang berarti spermatozoa belum mengalami kapasitasasi. (2) daerah *post acrosomal* atau 2 per 3 bagian ekuator kepala berwarna terang, yang berarti spermatozoa mengalami kapasitasasi. (3) daerah pangkal akrosom atau adanya bentukan cincin berwarna terang melingkar pada bagian tengah kepala, yang berarti spermatozoa telah mengalami reaksi akrosom.

Prinsip pewarnaan CTC adalah berdasarkan perpindahan CTC dari lingkungan ekstraseluler melintasi membran sel yang kemudian masuk ke dalam kompartemen intraseluler yang mengandung  $\text{Ca}^{2+}$ . Selanjutnya terjadi ikatan antara CTC dengan  $\text{Ca}^{2+}$ . Jika  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler berada dalam konsentrasi tinggi maka CTC yang berikatan dengan  $\text{Ca}^{2+}$  menjadi lebih berfluoresen. Gabungan CTC- $\text{Ca}^{2+}$  selanjutnya berikatan dengan bagian membran sel yang hidrofobik sehingga menghasilkan pola karakteristik pewarnaan membran dari bermacam-macam sesuai fase transisi kesetabilan membran (De Pauw dkk., 2003).

### 2.3 Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Gradien Albumin (Putih Telur)

Pemisahan spermatozoa atau sexing merupakan upaya untuk mengubah proporsi perolehan spermatozoa yang berkromosom sejenis (X atau Y) dengan metode tertentu, sehingga berubah dari proporsi normal (rasio alamiah), 50% banding 50% (Pratiwi dkk., 2006). Metode sexing didasarkan pada perbedaan diantara spermatozoa X dan Y (Prasad dkk., 2010). Oleh karena itu, berkembang metode sexing menggunakan sedimentasi, albumin *column*, sentrifugasi gradien densitas *percoll*, *elektroforesis*, *H-Y antigen*, *flow cytometri* dan *filtrasi dengan sephadex column* (Hafez dan Hafez, 2000). Pemisahan spermatozoa menggunakan albumin (putih telur)

merupakan metode yang mudah diterapkan di lapang, mudah diperoleh dan terjangkau (Saili dkk., 2000).

Putih telur dari telur ayam dapat digunakan sebagai albumin alternatif pengganti BSA dalam proses sexing dan dianggap cukup layak untuk digunakan (Saili dkk., 2000). Sexing dengan albumin putih telur didasarkan pada perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y dengan membuat medium yang berbeda konsentrasinya. Spermatozoa Y memiliki bentuk dan ukuran yang lebih kecil, mengandung DNA yang lebih sedikit dan mempunyai motilitas yang lebih tinggi dibandingkan spermatozoa X. Keadaan ini menyebabkan spermatozoa Y akan lebih cepat menembus media pemisah (putih telur) yang mempunyai konsentrasi tinggi, sedangkan spermatozoa X akan tetap berada pada media yang mempunyai konsentrasi rendah (Sianturi dkk., 2007).

Putih telur yang sering disebut albumen merupakan bagian dari telur yang berfungsi sebagai anti bakteri dan *buffer* untuk mempertahankan sifat fisik dan kimia telur (Li-Chan dkk., 1995). Menurut Belitz dkk. (2009) Protein merupakan bagian terbanyak yang menyusun putih telur dan terdiri atas *ovalbumin*, *ovotransferrin*, *ovomucin*, *lysozyme*, *avidin* dan *globulin*. *Ovalbumin*, merupakan protein yang dalam putih telur berada sekitar 45 %, dan bersifat *phosphoglycoprotein*. *Ovotransferrin* atau *conalbumin* berperan mengikat  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  dan  $\text{Ni}^{2+}$ . *Ovomucoid*, merupakan kekuatan pelindung proteolisis, pelindung tripsin, dan mengandung 22 % karbohidrat. *Ovomucin*, sebagai cadangan karbohidrat yang tidak dapat dipecahkan, merupakan serat protein dan berfungsi menjaga viskositas putih telur. *Lysozyme*, menghidrolisis ikatan  $\beta$  (1-4) glycosidic dalam dinding sel bakteri *peptidoglycan*, membantu pembentukan *oligosaccharides* dari dinding sel bakteri *tetrasaccharide* oleh *transglycosylation*. *Globulin*, sebagai stabilisator. *Ovoinhibitor*, sebagai pelindung *proteolytic* bermacam enzim, misalnya tripsin, *chymotrypsin*, papain dan *ficin*. *Avidin*, sebagai agen anti bakteri dan mengikat biotin.

Metode gradien albumin (putih telur) dapat memisahkan spermatozoa X dan Y dengan baik, tetapi memiliki kelemahan yaitu proses pemisahan dan sentrifugasi saat pencucian menyebabkan kerusakan membran spermatozoa (Saili dkk., 2000). Semakin lama pergerakan yang dilakukan oleh spermatozoa dalam menembus gradien albumin putih telur akan diikuti dengan peningkatan metabolisme dan peningkatan pembentukan sisa metabolisme sehingga terjadi laju penurunan motilitas spermatozoa hasil sexing (Sonjaya dkk., 2005).

Sentrifugasi saat pencucian menyebabkan spermatozoa mengalami gesekan fisik maupun kimia, yaitu gesekan antar spermatozoa dan antara spermatozoa dengan medium pengencer (Susilawati, 2005). Keadaan ini menyebabkan perubahan profil lipid, perubahan dan kerusakan

fosfolipid (fosfatidilkolin atau lesitin) penyusun membran, kerusakan tudung akrosom dan membran, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas membran (Tanphaicit dkk., 1996; Brandeis dan Manuel, 1993; White, 1993). Oleh karena itu, bahan-bahan yang seharusnya tidak dapat melewati membran dapat secara bebas keluar masuk dan akhirnya integritas membran menurun dan metabolisme terganggu (Susilawati, 2005; Agarwal dkk., 2003). Akibatnya sintesis ATP (*adenosine triphosphate*) tidak berjalan normal, sehingga motilitas dan viabilitas spermatozoa menurun (Susilowati, 2008). Spermatozoa yang hampir mati, ion-ion intraseluler mengalir ke luar dan ion-ion eksternal berpenetrasi dengan bebas ke dalam sel, akibat lemah atau nonaktifnya ATPase yang berperan mengatur keluar masuknya ion (Susilawati, 2011).

Dampak buruk lain akibat sentrifugasi adalah adanya peningkatan pembentukan ROS akibat terpisahnya seminal plasma dari spermatozoa (Susilowati, 2008; Ollero dkk., 2001). Seminal plasma mengandung bahan nutrisi bagi spermatozoa yang meliputi bahan elektrolit dan non elektrolit yang berupa ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , protein dan asam askorbat. Ion  $\text{Na}^+$  dan  $\text{K}^+$  berperan menjaga integritas fungsional membran plasma. Protein berperan melindungi membran plasma agar tetap lentur dan merupakan pelindung spermatozoa dari kerusakan yang bersifat *irreversible* (Nainar dkk., 1993). Asam askorbat sebagai antioksidan, berperan melindungi spermatozoa terhadap senyawa oksigen rektif ROS (Alvarez dkk., 1997). ROS dalam konsentrasi normal diperlukan sebagai mediator terhadap fungsi spermatozoa dan terlibat dalam induksi hiperaktifitas motilitas, kapasitasi dan reaksi akrosom serta fusi spermatozoa dengan sel telur (Dorota dan Kurpisz, 2004). Bila produksi ROS berlebihan dan tidak mampu dinetralkan oleh sistem pertahanan antioksidan yang ada pada spermatozoa atau seminal plasma mengakibatkan spermatozoa mudah mengalami peroksidasi lipid, kerusakan protein, kerusakan biomembran dan kerusakan DNA (Sikka, 2004).

## 2.4 Pengencer Andromed

Andromed merupakan medium pengencer tanpa kuning telur untuk semen beku dan cair (Aires dkk., 2003). Kuning telur pada pengencer Andromed digantikan oleh bahan kimia yang steril, sehingga penggunaannya tidak mempunyai resiko kontaminasi mikroorganisme serta mudah dalam penanganan dan penyimpanan (Nabiev dkk., 2003). Sexing spermatozoa dengan gradien albumin (BSA) menggunakan pengencer andromed dapat menghasilkan motilitas 66%, viabilitas 71%, proporsi spermatozoa X dan Y masing-masing 67% dan 32%, konsentrasi  $61,9 \times 10^6/\text{ml}$  (Udrayana, 2009). Andromed mampu menghasilkan motilitas dan ketahanan spermatozoa hasil pembekuan yang lebih baik dari pengencer triladyl (Herold dkk., 2004) tris kuning telur (Nehring dan Rothe, 2003; Aries dkk., 2003) dan Biochipos Plus (Rothe, 2003).

Menurut Simmet (2005) pengencer Andromed tersusun atas *aquabidest, fructose, glycerol, citric acid, buffer, phospholipid, spectinomycine, lincomycine, tylocin, gentamycine*. Aku dkk. (2007) menambahkan, selain lesitin Andromed juga mengandung protein, karbohidrat, mineral (natrium, kalsium, kalium, magnesium, klorida, fosfor, dan mangan), lemak dan *glyceryl phosphoryl choline* (GPC). Lesitin dalam Andromed merupakan lesitin nabati yang berasal dari kacang kedelai (Aires dkk., 2003). Pemanfaatan lesitin sebagai bahan preservasi dan kriopreservasi semen didasarkan bahwa umumnya membran plasma sel hewan dan manusia mengandung lesitin (fosfatidilkolin) sebagai salah satu komponen fosfolipid (Aku dkk., 2007). Kandungan lesitin dalam Andromed adalah sebesar 6,76 g/100 ml (Herdis dkk., 2008).

Lesitin yang terdapat dalam pengencer mengandung gliserol, asam lemak, asam fosfat dan kolin serta mempunyai fungsi struktur dan metabolisme pada membran (Devlin dkk., 1993 dalam Udrayana, 2009). Lesitin berperan dalam mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Hammadeh dkk., 2001). Mekanisme kerja lesitin dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu lesitin pada pengencer akan berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) sehingga mampu menstabilkan dan melindungi membran terhadap peroksidasi, dan menurunkan masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  ke dalam spermatozoa (White, 1993).

## **2.5 Pengencer *Cauda Epididymal Plasma 2* (CEP-2) Ditambah Kuning Telur 10%**

Adanya fakta yang menunjukkan bahwa spermatozoa sapi dapat disimpan selama 30 sampai 45 hari dalam kauda epididimis tanpa efek negatif terhadap kemampuan memfertilisasi sel telur (Asmarinah, 2010). Oleh karena itu, dikembangkan pengencer *Cauda Epididymal Plasma* (CEP-2) yang didasarkan pada kondisi kauda epididimis. Kauda epididimis dicirikan dengan pH yang rendah, tekanan hiperosmotik cairan, konsentrasi spermatozoa yang tinggi, tegangan oksigen yang rendah dan perbandingan ion  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  yang rendah. Komposisi pengencer CEP didasarkan pada pH, osmolaritas, konsentrasi ion  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  dan  $\text{P}^+$ , dan rasio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  seperti yang terdapat dalam plasma cauda epididimis sapi. Komposisi kimia yang terdapat dalam pengencer CEP-2 berupa  $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{CaCl}_2(\text{H}_2\text{O})_2$ ,  $\text{MgCl}_2(\text{H}_2\text{O})_6$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Fruktosa, Sorbitol, BSA, Tris, Gentamicin dan Asam sitrat, dengan osmolaritas sebesar 320 mOsm dan pH 6,6 (Verberckmoes dkk. 2004).

Ekstrak fruktosa dan tris dalam CEP-2 berperan untuk menjaga suplai energi, sebagai *buffering capacity*. Pengencer CEP-2 tidak mengandung glukosa, tetapi digantikan dengan asam sitrat dan fruktosa sebagai substrat energi bagi spermatozoa. Sorbitol berperan untuk meningkatkan osmolaritas agar sama seperti osmolaritas pada plasma kauda epididimis dan



menyediakan substrat alami sebagai energi cadangan bagi spermatozoa pada kondisi aerob (Verberckmoes dkk., 2004).

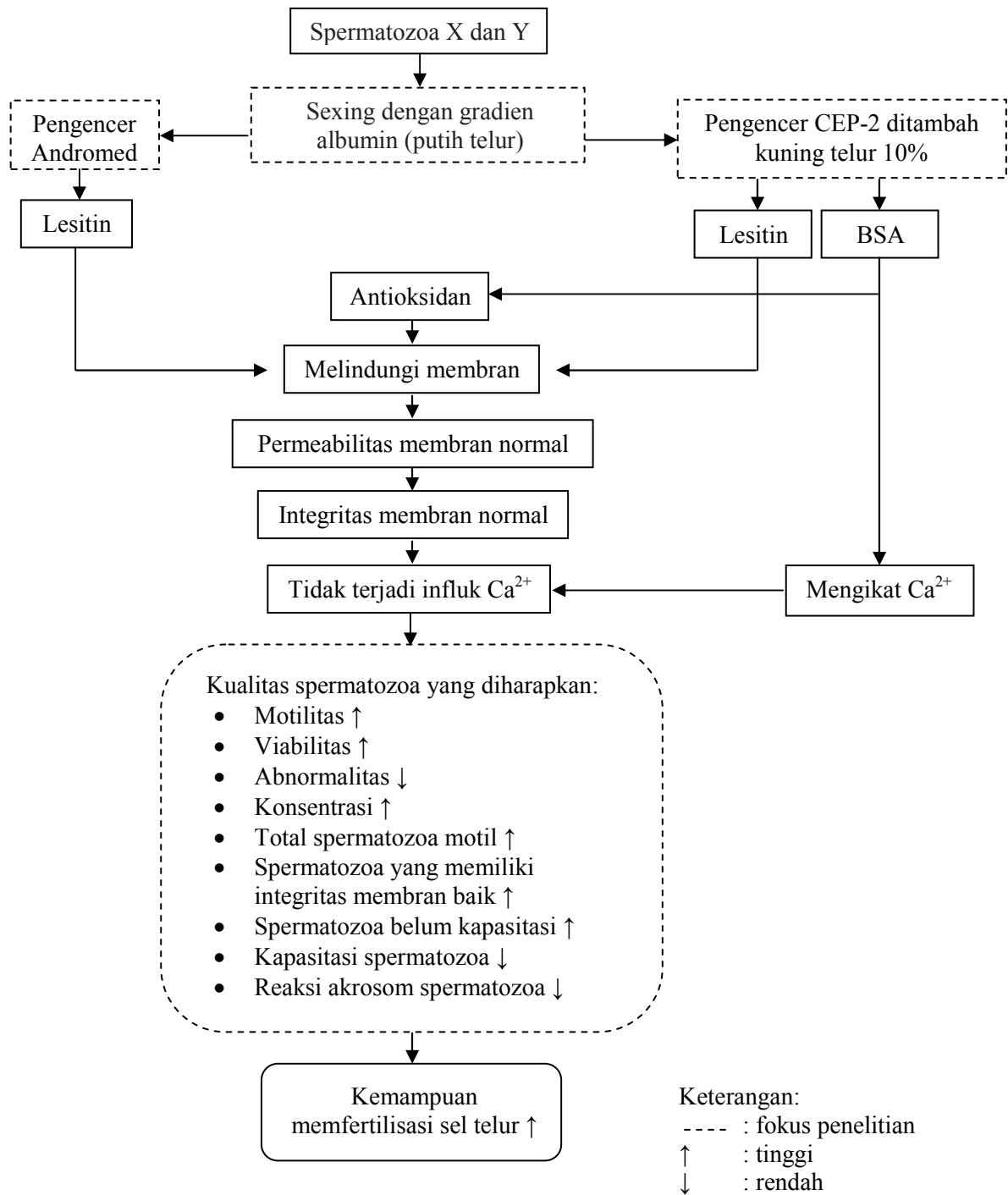
BSA dalam CEP-2 berperan sebagai komponen makromolekul (Verberckmoes dkk., 2004) yang mampu mencegah masuknya ion  $\text{Ca}^{2+}$  ke dalam spermatozoa. Albumin yang terkandung dalam BSA mampu mengikat ion  $\text{Ca}^{2+}$  pada membran plasma. Oleh karena itu, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan ion  $\text{Ca}^{2+}$  melewati membran dan menghambat akumulasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa, sehingga viabilitas dan motilitas spermatozoa dapat dipertahankan (Landim-Alvarenga dkk., 2004). Albumin yang terdapat dalam serum juga bertindak sebagai antioksidan yang mampu menghambat peroksidasi lipid penyusun membran sel sehingga penurunan motilitas spermatozoa dapat dihindari (Alvarez dan Storey, 1995).

Kuning telur mengandung 68% *low density lipoprotein* (LDL), 16% *high density lipoprotein* (HDL), 10% *livetins* dan 4% *phosvitins*. LDL memiliki berat jenis 0,98 dengan 83-89% lipid dan 11-17% protein. Lipid mengandung 74% *neutral lipid* (trigliserida dan kolesterol) dan 26% fosfolipid (Dauphas dkk., 2006). Kuning telur mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein. Lesitin secara alamiah ditemukan pada telur dalam jumlah 0,39% (Aku dkk., 2007). Lesitin dan lipoprotein yang dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Susilawati, 2002). Hasil penelitian Ducha (2012) penggunaan CEP-2 dengan suplementasi 20% kuning telur sebagai pengencer semen cair, menunjukkan dapat mempertahankan motilitas dan viabilitas spermatozoa. Penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan ROS, melindungi integritas membran dan mempertahankan spermatozoa non kapasitas, mempertahankan keutuhan ultrastruktur, dan kemampuan spermatozoa untuk memfertilisasi oosit.

# BAB III

## KERANGKA KONSEP PENELITIAN

### 3.1 Kerangka Pikir



Gambar 3.5 Diagram Alir Kerangka Pikir

Gradien albumin (putih telur) merupakan salah satu metode sexing spermatozoa X dan Y. Prinsip dari metode ini adalah membuat medium yang berbeda konsentrasinya, sehingga spermatozoa Y yang mempunyai motilitas lebih cepat mampu menembus konsentrasi medium yang lebih pekat pada lapisan tengah dan lapisan bawah. Sedangkan spermatozoa X yang memiliki motilitas lebih lambat akan tetap berada pada medium yang mempunyai konsentrasi rendah pada lapisan atas dan lapisan tengah (Sianturi dkk., 2007).

Sentrifugasi saat pencucian pada proses sexing terhadap spermatozoa mengakibatkan kerusakan dan perubahan profil lipid membran akibat terjadinya gesekan (Susilawati, 2005; Tanphaicit dkk., 1996). Bagian membran yang rusak terlebih dahulu adalah fosfatidilkolin karena berada pada bagian membran paling luar (White, 1993). Akibatnya terjadi peningkatan permeabilitas dan penurunan integritas membran (Agarwal dkk., 2003), sehingga mempermudah masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  ekstraseluler melalui  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  *exchanger* dan *channel*  $\text{Ca}^{2+}$  yang menyebabkan konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler meningkat (Florman dan Ducibella, 2006). Peningkatan influk  $\text{Ca}^{2+}$  intaseluler merupakan salah satu faktor pemicu kapasitas dan hiperaktifitas motilitas, peningkatan fosforilasi protein tirosin dan reaksi akrosom spermatozoa (Huang dkk., 2009). Sentrifugasi juga dapat meningkatkan pembentukan ROS oleh spermatozoa (Susilowati, 2008; Ollero dkk., 2001) akibat terpisahnya spermatozoa dari seminal plasma yang mengandung bahan nutrien dan antioksidan (Nainar dkk., 1991; Alvarez dkk., 1997). Akibatnya, perlindungan spermatozoa terhadap serangan senyawa oksigen reaktif berkurang (Sikka, 2004). Kadar ROS yang tinggi mengakibatkan terjadinya peroksidasi lipid, sehingga menghasilkan senyawa MDA (*malonaldehid*) yang dapat merusak membran. Keadaan ini menyebabkan integritas dan membran plasma utuh spermatozoa menurun (Ollero dkk., 2001; Susilowati, 2008).

Untuk mengurangi terjadinya kerusakan dan perubahan struktur membran spermatozoa akibat proses sentrifugasi, maka diperlukan pengencer yang mampu melindungi dan menjaga kesetabilan membran. Apabila terjadi kerusakan membran spermatozoa, yang harus dilindungi adalah bagian-bagian yang ada di dalam struktur membran spermatozoa tersebut yaitu fosfatidilkolin atau lesitin. Pengencer yang mengandung lesitin diantaranya adalah andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Andromed mengandung lesitin nabati dari ekstrak kacang kedelai (Aires dkk., 2003), sedangkan kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein (Aku dkk., 2007). Lesitin yang terkandung di dalam pengencer berperan mempertahankan dan melindungi integritas membran spermatozoa (Hammadeh dkk., 2001). Makromolekul dalam kuning telur yang berupa lipid dan protein menjadi target oksidasi oleh ROS, sehingga ROS tidak mengoksidasi membran spermatozoa (Ducha, 2012).

Albumin dalam BSA bertindak sebagai antioksidan yang mampu menghambat peroksidasi lipid penyusun membran sel, sehingga penurunan kualitas spermatozoa dapat diminimalisir (Alvarez dan Storey, 1995). BSA merupakan makromolekul yang berperan mengikat  $\text{Ca}^{2+}$ , mencegah masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan kalsium melewati membran dan menghambat akumulasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa (Landim-Alvarenga dkk., 2004). Membran yang terlindung memiliki permeabilitas dan integritas yang tetap berfungsi dengan baik, sehingga perubahan regulasi ion yaitu masuknya ion  $\text{Ca}^{2+}$  ke dalam spermatozoa secara berlebihan dapat dinetralisir. Oleh karena itu motilitas, viabilitas, spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa belum kapasitasi dapat dijaga tetap tinggi, sedangkan abnormalitas, kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa dijaga tetap rendah.

Fruktosa dan asam sitrat yang terkandung dalam pengencer Andromed dan CEP-2 berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Simmet, 2005; Verberckmoes dkk., 2004), sehingga spermatozoa memiliki energi untuk bergerak dan untuk tetap menormalkan kondisi fisiologisnya dalam menembus medium albumin dengan konsentrasi yang tinggi. Spermatozoa dengan motilitas tinggi juga memiliki kemampuan memisah lebih besar yang menyebabkan proporsi perolehan spermatozoa X dan Y dengan jumlah banyak (Susilawati, 2002). Total spermatozoa X dan Y motil dipengaruhi oleh konsentrasi spermatozoa, sehingga parameter konsentrasi dan proporsi perolehan spermatozoa X dan Y berperan dalam menentukan keberhasilan teknik sexing. Apabila konsentrasi tinggi dan proporsi perolehan spermatozoa X dan Y tinggi, maka jumlah spermatozoa X dan Y motil menjadi tinggi dan berpeluang terhadap keberhasilan fertilisasi dan perolehan jenis kelamin anak yang diharapkan (Udrayana, 2009).

### **3.2 Hipotesis**

1. Pengencer Andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berpengaruh terhadap kualitas dan membran spermatozoa hasil sexing menggunakan gradien albumin (putih telur).
2. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada andromed dalam menjaga kualitas dan membran spermatozoa setelah sexing dengan gradien albumin (putih telur)

### **3.3 Definisi Operasional**

1. Motilitas individu spermatozoa dinyatakan dalam persentase jumlah spermatozoa yang bergerak aktif ke depan dalam satu lapangan pandang menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali.

2. Viabilitas spermatozoa dinyatakan dalam persentase jumlah spermatozoa yang hidup dihitung dari 200 pengamatan spermatozoa dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali.
3. Abnormalitas spermatozoa dinyatakan dalam persentase jumlah spermatozoa abnormal minimal 200 spermatozoa. Kategori spermatozoa yang abnormal, yaitu: tidak ada ekor, abnormal kepala dan bentuk ekor abnormal.
4. Konsentrasi merupakan jumlah spermatozoa per ml semen yang dihitung dari 5 kotak (kamar hitung) pada objek *haemo sitometer thoma* dan diamati dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali.
5. Total spermatozoa yang motil adalah hasil perkalian antara volume semen dengan konsentrasi spermatozoa dan dengan persentase motilitas spermatozoa individu.
6. Integritas membran spermatozoa adalah suatu keadaan yang menunjukkan mekanisme fungsi fisiologis membran tetap terjaga sebagai kontrol terhadap sistem transport. Spermatozoa yang memiliki membran utuh apabila mempunyai ekor melingkar yang diuji dalam larutan hipoosmotik atau pengujain HOST(*hypo osmotic swelling test*). Pengamatan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali.
7. Spermatozoa belum kapasitasi adalah hasil pengamatan menggunakan pewarna CTC (*Chlortetracycline*). Pengamatan menggunakan mikroskop *epi fluorescence* dengan pembesaran 400 kali. Spermatozoa belum kapsitasi dicirikan dengan seluruh kepala berwarna terang.
8. Kapasitasi spermatozoa adalah hasil pengamatan menggunakan pewarna CTC. Pengamatan menggunakan mikroskop *epi fluorescence* dengan pembesaran 400 kali. Kapasitasi dicirikan dengan daerah *post acrosomal* atau setengah bagian atas kepala berwarna terang.
9. Reaksi akrosom spermatozoa adalah hasil pengamatan membran spermatozoa menggunakan pewarna CTC dan dievaluasi dengan mikroskop *epi fluoresence* dengan pembesaran 400 kali, yang dicirikan dengan adanya bentukan cincin berwarna terang melingkar pada bagian tengah kepala atau daerah pangkal akrosom.

## **BAB IV**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **4.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai Agustus 2012. Proses sexing, pengamatan kualitas dan pengamatan integritas membran dilaksanakan di Laboratorium Reproduksi Ternak Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya Malang. Pengamatan spermatozoa belum kapasitas, kapasitas dan reaksi akrosom dilaksanakan di Laboratorium Biologi Seluler Molekuler Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Brawijaya Malang.

#### **4.2 Prosedur Penelitian**

##### **4.2.1 Penampungan semen**

Sampel semen yang digunakan yaitu semen segar yang berasal dari Sapi Limousin yang dipelihara di Balai Besar Inseminasi Buatan (BBIB) Singosari Malang. Frekuensi penampungan semen satu minggu dua kali menggunakan vagina buatan. Semen yang digunakan memiliki kriteria motilitas massa ++ atau +++ dan motilitas individu lebih dari 70%. Semen yang diperoleh dari BBIB Singosari Malang dibawa ke Laboratorium Reproduksi dengan cara diletakkan dibawah ketiak, didekatkan dengan badan.

##### **4.2.2 Pembuatan Pengencer Semen**

###### **4.2.2.1 Pengencer Andromed**

Andromed dimasukkan dalam gelas ukur 50 ml. Kemudian ditambahkan aquabidest dengan perbandingan antara Andromed dan aquabidest adalah 1:4, dan dihomogenkan.

###### **4.2.2.2 Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%**

Pengencer CEP-2 dikembangkan oleh Verberckmoes dkk., (2004) komposisi dan cara pembuatan CEP-2 terdapat pada Lampiran 1. Pengencer CEP-2 yang telah dibuat kemudian ditambahkan 10% kuning telur. Kuning yang ditambahkan dalam CEP-2 berasal dari peternakan ayam organik.

##### **4.2.3 Pemisahan Spermatozoa**

Putih telur yang digunakan untuk membuat gradien albumin adalah bagian putih telur yang encer. Pembuatan gradien albumin dimulai dengan mencampur pengencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10% dengan putih telur. Perbandingan putih telur dengan pengencer andromed atau CEP-2 terdapat pada tabel 4.1 dan tabel 4.2.

Tabel 4.1 Perbandingan Konsentrasi Putih Telur dengan Andromed

Konsentrasi putih telur (%)	Volume putih telur (ml)	Volume Adromed (ml)	Volume Total (ml)
10	0,15	1,35	1,5
30	0,45	1,05	1,5
50	0,75	0,75	1,5

Tabel 4.2 Perbandingan Konsentrasi Putih Telur dengan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%

Konsentrasi putih telur (%)	Volume putih telur (ml)	Volume CEP-2 (ml)	Volume Total (ml)
10	0,15	1,35	1,5
30	0,45	1,05	1,5
50	0,75	0,75	1,5

Setelah larutan tercampur rata, larutan dimasukkan pada tabung reaksi sesuai dengan gradiennya, yaitu masing-masing 1,5 ml dari konsentrasi putih telur terbesar (50%) sampai yang paling kecil (10%). Kemudian menuang 1 ml semen yang telah diencerkan dengan pengencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10% (perbandingan 1:1) melalui dinding tabung secara perlahan, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 10 menit. Mengambil 1 ml lapisan pada bagian atas dan bawah, kemudian ditempatkan pada tabung berbeda, yang masing-masing sudah berisi 3 ml pengencer andromed atau CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. *Supernatant* yang bening dibuang sebanyak 2 ml dan *pellet* disisakan 2 ml. Mengamati motilitas, konsentrasi dan membuat preparat ulas serta dilakukan uji menggunakan HOST dan CTC (Susilawati, 2003) (Lampiran 2).

#### 4.2.4 Pengamatan

##### 4.2.4.1 Pemeriksaan Makroskopis Semen:

- a. pH : Mengambil semen menggunakan ose dan diletakkan pada kertas lakmus atau pH meter, pH normal semen yaitu 6.2-7.
- b. Warna : Dilihat langsung pada tabung penampung, semen normal berwarna putih kekuningan atau putih susu (Toelihere, 1993).

##### 4.2.4.2 Pemeriksaan Mikroskopis Semen

###### a. Motilitas Massa

Semen diambil menggunakan ose, diletakkan pada kaca objek dan diamati dengan menggunakan mikroskop tanpa kaca penutup dengan pebesaran 100 kali. Gerakan massa diamati dengan melihat gelombang pergerakan spermatozoa secara bersama-sama dan dihitung dengan 4 kriteria sebagai berikut: Penilaian sangat baik (+++) bila terlihat gelombang besar, banyak, gelap, tebal dan aktif bergerak. Dinilai baik (++) gelombangnya kecil, tipis, jarang,

tidak jelas dan lamban. Dinilai cukup (+) bila tidak ada gelombang hanya gerakan individual dan aktif progresif dan dinilai buruk (-) bila tidak ada gerakan sama sekali (Toelihere, 1993).

#### **b. Motilitas Individu**

Semen diambil menggunakan ose, diletakkan pada kaca objek dan ditutup dengan kaca penutup. Gerak individu spermatozoa diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Kriteria motilitas adalah sebagai berikut: dinilai kurang dari 50% bila tidak ada gelombang atau gerakannya melingkar, 50-80% bila ada gerakan massa, lebih dari 80-90% bila ada gelombang dan dinilai lebih dari 90% bila ada gelombang sangat cepat (Partodihardjo, 1992).

#### **c. Viabilitas**

Pengamatan viabilitas spermatozoa dilakukan menggunakan preparat ulas. Satu tetes semen diletakkan pada ujung kaca objek. Larutan eosin-negrosin ditetaskan satu tetes didekat semen, keduanya dicampur. Kemudian ditutup dengan kaca penutup lain pada ujungnya yang membentuk sudut 45°C dan ditarik ke arah ujung yang lain. Preparat ulas tersebut dikering anginkan kemudian diamati menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 400 kali. Menghitung spermatozoa yang hidup, yaitu spermatozoa yang tidak berwarna dan spermatozoa yang mati, yaitu spermatozoa yang berwarna merah. Jumlah spermatozoa hidup dan mati dihitung minimal 200 spermatozoa (Partodiharjo, 1992).

$$\text{Viabilitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa hidup}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

#### **d. Abnormalitas**

Perhitungan abnormalitas spermatozoa dilakukan terhadap preparat ulas dan dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 400 kali. Pengamatan difokuskan pada bagian kepala, leher, dan ekor yang abnormal. Pengamatan dilakukan terhadap minimal 200 spermatozoa dan ada lima kategori spermatozoa yang abnormal, yaitu: tidak ada ekor, abnormal kepala, bentuk ekor abnormal dengan adanya *sitoplasmic droplet* pada bagian *proximal* dan bentuk abnormal ekor pada bagian *distal droplet* (Toelihere, 1993).

$$\text{Abnormalitas (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa abnormal}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

#### **e. Konsentrasi**

Semen dihisap dengan pipet *erythrocyte* sampai angka 0,5, kemudian NaCl 3% dihisap sampai angka 101. Kemudian pipet *erythrocyte* digoyang membentuk angka 8 selama 2-3 menit. Membuang 2-3 tetes pertama dan digoyang lagi selama 1 menit. Membuang 1-2 tetes, kemudian meneteskan 1 tetes pada kamar hitung (*chamber*) kemudian ditutupi *cover glass* dan



diamati dengan mikroskop cahaya perbesaran 400 kali. Jumlah spermatozoa dihitung pada lima kotak besar (satu kotak besar ada 16 kotak kecil) yaitu dua sudut kanan dan kiri atas, dua sudut kanan dan kiri bawah dan satu di tengah. Jumlah spermatozoa dihitung pada kelima kotak dan dikalikan  $10^7$  (Partodiharjo, 1992).

**f. Total Spermatozoa motil**

Total spermatozoa motil = volume semen  $\times$  konsentrasi  $\times$  persentase motilitas individu  
(Susilawati, 2011).

**4.2.4.3 Pengamatan Membran Spermatozoa**

**a. Integritas Membran Menggunakan HOST**

Satu mili liter larutan hipoosmotik dalam 125 mOsm/l (yang dibuat dari 0,31 g Natrium sitrat dan 0,565 g fruktosa dilarutkan dalam 50 ml aquades) ditambah dengan 100  $\mu$ l spermatozoa. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, selanjutnya dibuat preprat ulas dan diamati dengan mikroskop cahaya pembesaran 400 kali. Perubahan yang khas, pada spermatozoa yang membrannya normal atau membran utuh yaitu adanya pembengkakan atau ekornya melingkar pada bagian ujung, sedangkan spermatozoa yang membrannya tidak normal atau mengalami kerusakan membran ditunjukkan dengan ekor lurus (Correa dan Zavos, 1994).

$$\text{Membran normal (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa yang memiliki membran normal}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

**b. Kapasitasi Menggunakan Pewarna *Chlortetracycline* (CTC)**

Pada pewarnaan CTC terdapat tiga reagen akhir, yaitu : larutan DABCO, larutan CTC *Fixative* dan larutan Pewarna CTC, komposisi dan cara pembuatannya terdapat pada Lampiran 3. Semen 100  $\mu$ l dimasukkan dalam tabung *eppendorf* yang ditutup *aluminium foil*. kemudian ditambah 100  $\mu$ l pewarna CTC, divortex selama 1 menit. Kemudian ditambahkan 8  $\mu$ l CTC fiksatif dan dihomogenkan dengan *vortex* selama 1 menit, dari larutan tersebut diambil 10  $\mu$ l dan ditempatkan pada kaca objek, kemudian ditambahkan 10  $\mu$ l DABCO dan dicampur secara hati-hati, kemudian ditutup dengan kaca penutup. Selanjutnya ditutup dengan kertas tisu tebal dan ditekan secara hati-hati, selanjutnya tepi kaca penutup diolesi dengan *cutex*. Pengamatan dilakukan dengan Mikroskop *Epi-fluoresence* (Nikon Mikroskop OPTIPHOT-2 menggunakan filter UV-2A) dengan perbesaran 400 kali terhadap 100 spermatozoa dari satu lapangan pandang preparat (Fraser dkk., 1995). Gambaran yang tampak adalah (1) seluruh kepala berwarna terang, yang berarti spermatozoa belum mengalami kapasitasi; (2) daerah *post acrosomal* atau setengah bagian atas kepala berwarna terang, yang berarti spermatozoa mengalami kapasitasi; (3) adanya bentukan cincin berwarna terang melingkar pada bagian

tengah kepala atau daerah pangkal akrosom, yang berarti spermatozoa telah mengalami reaksi akrosom (Kaul dkk., 2001).

$$\text{Belum kapasitasi (\%)} = \frac{\text{jumlah spermatozoa belum kapasitasi}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

$$\text{Kapasitasi (\%)} = \frac{\text{jumlah kapasitasi spermatozoa}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

$$\text{Reaksi akrosom (\%)} = \frac{\text{jumlah reaksi akrosom spermatozoa}}{\text{jumlah spermatozoa yang diamati}} \times 100\%$$

#### 4.3 Variabel Penelitian

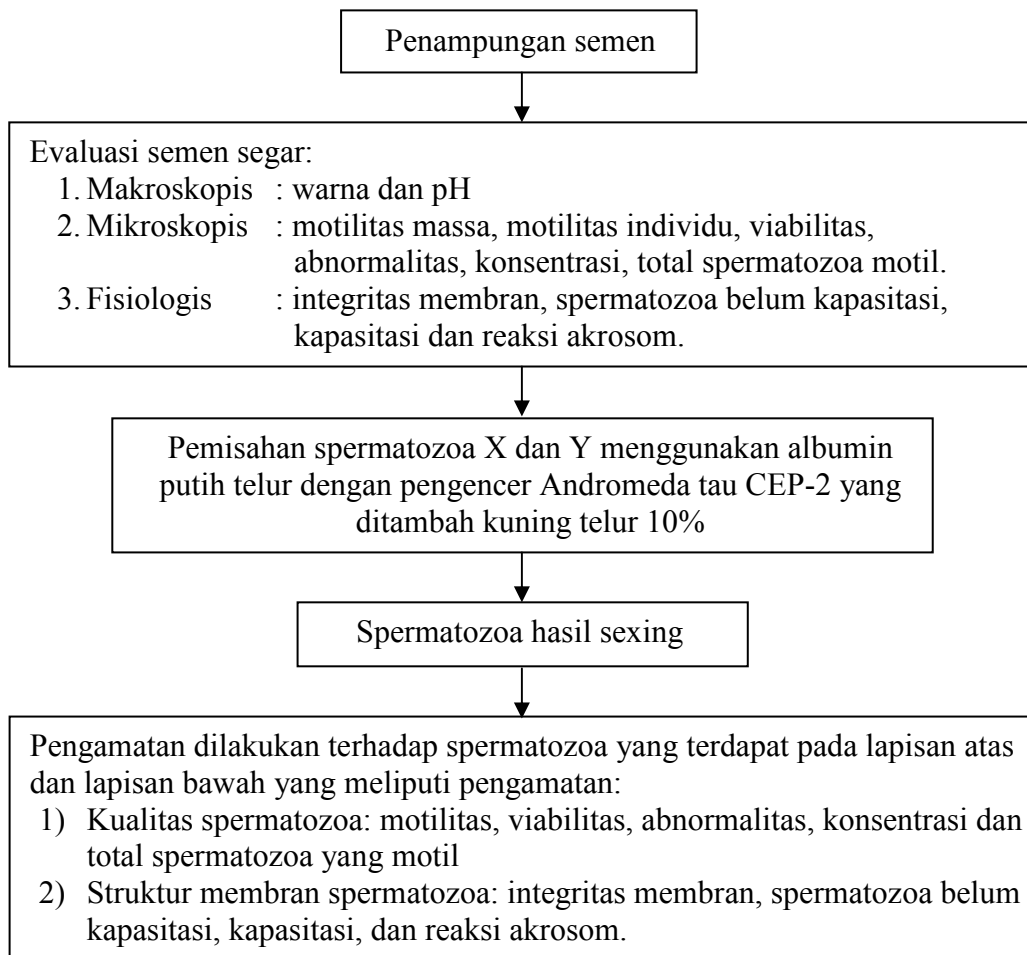
Variabel yang diamati adalah kualitas dan membran spermatozoa pada lapisan atas dan lapisan bawah setelah sexing. Parameter yang diamati untuk kualitas spermatozoa adalah motilitas, viabilitas, abnormalitas, konsentrasi dan total spermatozoa motil. Parameter yang diamati untuk membran spermatozoa adalah spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, spermatozoa belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom. Hubungan antara motilitas dengan spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, kapasitasi dan reaksi akrosom dibahas sebagai data pendukung untuk mengetahui hubungan antara motilitas dengan membran spermatozoa.

#### 4.4 Analisis Data

Data yang berbentuk persentase ditransformasi, dengan ketentuan: data persentase yang menyebar antara 0%-30% atau 70%-100% tidak perlu ditransformasi ke arcsin, cukup ditransformasi akar kuadrat, sedangkan data yang menyebar antara 30%-70% tidak perlu ditransformasikan (Sastrosupadi, 2000). Data kemudian diuji dengan teknik analisa berikut:

1. Analisis data dengan menggunakan uji t berpasangan untuk mengetahui perbedaan perlakuan penggunaan pengencer pada setiap lapisan.
2. Analisa regresi korelasi antara motilitas dengan integritas membran, motilitas dengan kapasitasi dan motilitas dengan reaksi akrosom.

#### 4.6 Kerangka Operasional



Gambar 4.6 Diagram Alir Kerangka Operasional Penelitian

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Kualitas Semen Segar

Semen segar sebelum digunakan untuk penelitian terlebih dahulu diuji kualitasnya. Pengujian semen segar perlu dilakukan untuk mengetahui kualitas semen yang dikoleksi. Semen diperiksa secara makroskopis dan mikroskopis, selanjutnya dilakukan pemeriksaan integritas membran, spermatozoa belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom. Hasil pemeriksaan semen segar terdapat pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3. Hasil Pemeriksaan Semen Segar

Parameter	Rerata $\pm$ SD
pH	7 $\pm$ 0,00
Warna	Putih kekuningan
Motilitas massa	++
Motilitas individu (%)	70 $\pm$ 0,00
Viabilitas (%)	95,12 $\pm$ 1,42
Abnormalitas (%)	5,28 $\pm$ 3,46
Konsentrasi ( $10^6$ /ml)	1432,50 $\pm$ 450,80
Total spermatozoa motil ( $10^6$ /ml)	1106,88 $\pm$ 390,56
Integritas membran (%)	88,59 $\pm$ 3,74
Belum kapasitasi (%)	87,55 $\pm$ 3,79
Kapasitasi (%)	9,37 $\pm$ 2,86
Reaksi akrosom (%)	3,08 $\pm$ 1,01

Berdasarkan Tabel 5.3 hasil pemeriksaan makroskopis semen segar menunjukkan pH 7 $\pm$ 0,00 dan warna putih kekuningan. Semen segar dengan pH 7 yang digunakan dalam penelitian ini dapat dikatakan normal karena menurut Garner dan Hafez (2008) rata-rata pH semen yang normal adalah 6,4 - 7,8. pH dan warna semen segar dalam penelitian ini tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Sianturi dkk. (2004) dan Pratiwi dkk. (2006) yang menunjukkan pH 7 dengan warna putih kekuningan.

Salah satu ciri spermatozoa yang berkualitas baik adalah mempunyai gerakan massa dan motilitas progresif. Semakin aktif dan semakin banyak spermatozoa yang bergerak ke depan, maka gerakan massa akan semakin baik. Hasil pemeriksaan mikroskopis semen segar pada Tabel 5.3 menunjukkan motilitas massa ++ dan motilitas individu 70 $\pm$ 0,00%. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa kualitas semen segar yang digunakan sebagai materi penelitian adalah baik, karena berada di atas persyaratan minimal semen yang digunakan untuk sexing. Penelitian Rahmah (2007) memperlihatkan hasil motilitas massa dan motilitas individu spermatozoa semen segar adalah ++ dengan motilitas individu 71,75%. Semen segar yang digunakan dalam penelitian

ini memiliki motilitas tinggi, agar spermatozoa mampu menembus gradien albumin (putih telur) ketika proses sexing. Persentase viabilitas spermatozoa semen segar adalah  $95,12 \pm 1,42\%$ . Nilai viabilitas tersebut masih termasuk dalam kisaran normal dan tergolong tinggi. Penelitian Pratiwi dkk. (2006) menunjukkan hasil persentase viabilitas spermatozoa semen segar  $93,5 \pm 2,1\%$ . Hasil pengamatan abnormalitas spermatozoa semen segar  $5,28 \pm 3,46\%$ . Nilai tersebut tergolong rendah karena kurang dari 20%. Semen yang memiliki proporsi abnormalitas yang tinggi akan berpengaruh terhadap fertilitas. Jika abnormalitas spermatozoa lebih dari 20% hal ini menunjukkan kualitas semen yang rendah (Hafez dan Hafez, 2000) dan tidak layak untuk proses lebih lanjut. Hasil pengamatan abnormalitas dalam penelitian tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Pamungkas dkk., (2005) dimana nilai abnormalitas spermatozoa semen segar 7,47%. Konsentrasi semen segar adalah  $1432,50 \pm 450,80 \times 10^6/\text{ml}$ , dan nilai konsentrasi tersebut tergolong normal, karena menurut Garner dan Hafez (2000) konsentrasi spermatozoa sapi adalah  $800 \times 10^6$  sampai  $2000 \times 10^6/\text{ml}$ , dengan jumlah spermatozoa per ejakulasi  $5 \times 10^9$ - $15 \times 10^9$ . Hasil penelitian ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Sianturi dkk. (2004) yang mendapatkan hasil konsentrasi spermatozoa semen segar sebesar  $1351 \pm 330 \times 10^6/\text{ml}$ .

Pemeriksaan fisiologis semen segar pada Tabel 5.3 menunjukkan spermatozoa yang memiliki integritas membran baik adalah  $88,59 \pm 3,75\%$ . Tingginya Persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dalam penelitian ini sesuai dengan tingginya nilai motilitas massa (++) dan motilitas individu (70%). Karena menurut Saili dkk. (2000) jika motilitas individu spermatozoa tinggi dan motilitas massa mempunyai nilai ++ atau +++ maka nilai integritas membran spermatozoa akan tinggi pula, dimana spermatozoa semen segar yang memiliki membran baik adalah  $83,1 \pm 2,3\%$ . Hasil pengamatan spermatozoa semen segar dengan pewarna fluoresen CTC menunjukkan spermatozoa belum kapasitasasi  $87,55 \pm 3,79\%$ , kapasitasasi spermatozoa  $9,37 \pm 2,86\%$  dan reaksi akrosom spermatozoa  $3,08 \pm 1,01\%$ . Penelitian yang dilakukan oleh Rahmah (2007) memperlihatkan hasil yang tidak jauh berbeda, yaitu nilai spermatozoa belum kapasitasasi  $82,5 \pm 17,47\%$ , kapasitasasi  $42,35 \pm 25,81\%$  dan reaksi akrosom  $43,85 \pm 17,20\%$ . Berdasarkan hasil pengamatan fisiologis membran spermatozoa menunjukkan bahwa spermatozoa semen segar yang digunakan dalam penelitian ini memiliki kualitas bagus, karena terdapat spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa belum kapasitasasi dalam jumlah banyak, sedangkan kapasitasasi dan reaksi akrosom spermatozoa berada dalam jumlah sedikit, yang artinya secara fisiologi membran spermatozoa berada dalam kondisi normal.

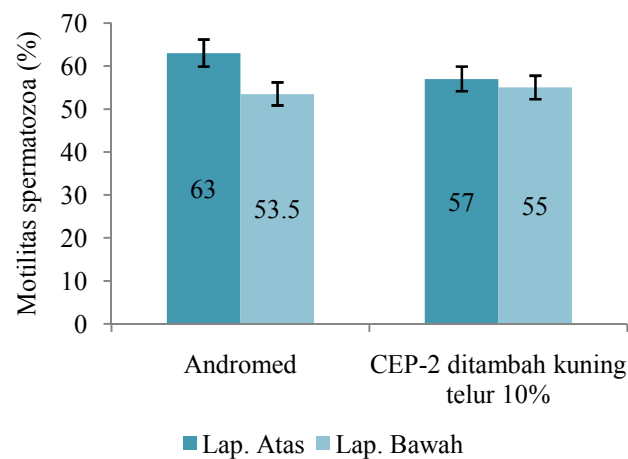
## 5.2 Kualitas Spermatozoa Setelah Sexing dengan Gradien Albumin (Putih Telur) Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%

### 5.2.1 Persentase Motilitas Spermatozoa

Data rata-rata motilitas spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah seperti terdapat pada Tabel 5.4 dan Gambar 5.7.

Tabel 5.4 Rata-Rata Persentase Motilitas Spermatozoa Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
63 ± 2,58	53,5 ± 3,37	57 ± 4,83	55 ± 7,07



Gambar 5.7 Rata-Rata Persentase Motilitas Spermatozoa Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dapat menjaga motilitas spermatozoa pada lapisan atas lebih tinggi daripada lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P > 0,05$ . Sedangkan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga motilitas spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Pengencer andromed dapat menjaga motilitas spermatozoa pada lapisan atas lebih tinggi daripada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dengan derajat kepercayaan  $P > 0,05$ . Perhitungan persentase motilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 4.

Motilitas spermatozoa hasil sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas yang diduga sebagai spermatozoa X lebih tinggi daripada lapisan bawah yang diduga sebagai spermatozoa Y (Tabel 5.4). Keadaan ini diduga disebabkan karena spermatozoa pada lapisan bawah telah melewati 3 gradien albumin putih telur dengan konsentrasi 10%, 30% dan 50%. Dimana, semakin tinggi konsentrasi albumin putih telur menyebabkan viskositas larutan meningkat yang dapat mempersulit gerak spermatozoa untuk

menembus gradien tersebut, sehingga energi yang dikeluarkan lebih banyak yang berakibat pada penurunan motilitas (Sianturi dkk., 2004).

Pengencer andromed lebih baik daripada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam menjaga motilitas spermatozoa hasil sexing (Tabel 5.4). Keadaan ini diduga karena pengencer andromed mengandung gliserol, yaitu zat yang dapat berdifusi ke dalam spermatozoa dan dapat diproses sehingga menghasilkan energi. Dalam keadaan aerob, gliserol berfungsi sebagai penghasil fruktosa, lebih sedikit asam laktat yang terbentuk, dan spermatozoa menunjukkan aktivitas yang optimum (Aires dkk., 2003). Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mempertahankan motilitas spermatozoa hasil sexing lebih tinggi dari standar *Post Thawing Motility* (PTM) yaitu >40% (Toelihere, 1993). Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu mempertahankan motilitas spermatozoa. Fruktosa dan asam sitrat yang terkandung dalam pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berperan sebagai sumber energi (Simmet, 2005; Verberckmoes dkk., 2004), sehingga spermatozoa memiliki energi yang cukup untuk bergerak dan untuk tetap menormalkan kondisi fisiologisnya dalam menembus medium albumin. Pengencer andromed dan CEP-2 mempunyai osmolaritas masing-masing sebesar 330 dan 320 mOsm (Minitub, 2001 dalam Herdis dkk., 2008; Verberckmoes dkk. 2004). Dimana integritas membran dan motilitas spermatozoa terbaik diperoleh ketika osmolaritas medium pengencer sekitar 300 mOsm (De Pauw dkk., 2003). Pengencer CEP-2 memiliki konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}^+$ , dan  $\text{Mg}^{2+}$  yang lebih tinggi daripada pengencer CEP-1. Tingginya konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{P}^+$ , dan  $\text{Mg}^{2+}$  diperlukan untuk menginisiasi motilitas progresif, dimana  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  terlibat dalam aktivasi adenil siklase. Tingginya aktivitas adenil siklase akan meningkatkan konsentrasi cAMP yang dapat meningkatkan dan memperpanjang motilitas progresif spermatozoa (Verberckmoes dkk. 2004, Asmarinah, 2010). Penelitian Susilawati (2002), sexing dengan albumin putih telur menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur memperlihatkan hasil motilitas spermatozoa 50,5% pada lapisan atas dan 41% pada lapisan bawah. Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga motilitas spermatozoa hasil sexing lebih tinggi daripada pengencer tris aminomrthan kuning telur.

### 5.2.2 Persentase Viabilitas Spermatozoa

Pengamatan viabilitas spermatozoa menggunakan pewarna eosin-negrosin. Spermatozoa yang hidup tidak menyerap eosin-negrosin sehingga spermatozoa tidak berwarna, sedangkan spermatozoa yang mati menyerap eosin-nigrosin, sehingga berwarna merah. Spermatozoa yang mati permeabilitas membrannya meningkat, akibatnya zat warna eosin-nigrosin dengan mudah melintasi membran dan masuk ke dalam spermatozoa, sedangkan spermatozoa yang hidup permeabilitas membrannya tetap normal sehingga eosin-nigrosin tidak dapat melintasi membran. Gambar spermatozoa hasil pewarnaan eosin-nigrosin terdapat pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Hasil Pengamatan Viabilitas Spermatozoa

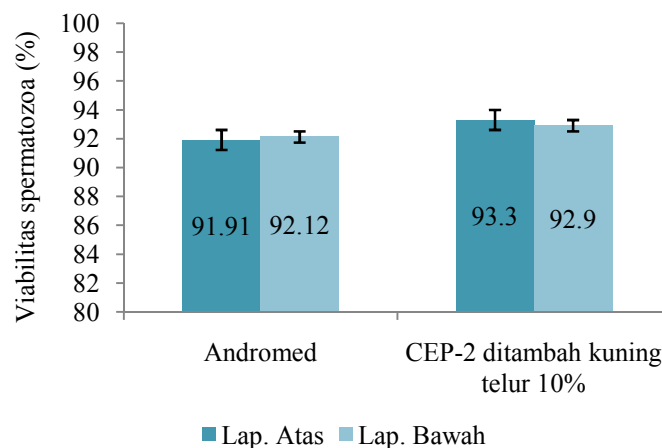
Keterangan A : spermatozoa mati

B : spermatozoa hidup

Data rata-rata persentase viabilitas spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah seperti terdapat pada Tabel 5.5 dan Gambar 5.9.

Tabel 5.5 Rata-Rata Persentase Viabilitas Spermatozoa Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
91,91 ± 3,88	92,12 ± 1,78	93,3 ± 4,03	92,9 ± 2,04



Gambar 5.9 Rata-Rata Persentase Viabilitas Spermatozoa Sesudah Sexing

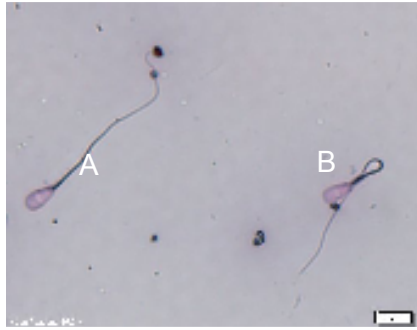


Sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga viabilitas spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Perhitungan persentase viabilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 5. Persentase viabilitas spermatozoa pada hasil penelitian ini diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah spermatozoa yang hidup dibagi dengan jumlah spermatozoa yang hidup dan spermatozoa yang mati kemudian dikalikan 100%.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu mengurangi penurunan viabilitas spermatozoa hasil sexing. Keadaan ini diduga karena pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu menyediakan lingkungan yang baik bagi spermatozoa dan melindungi membran, sehingga permeabilitas membran tetap normal. Penelitian Pratiwi dkk. (2006) sexing menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur memperlihatkan hasil viabilitas spermatozoa pada lapisan atas  $85,0 \pm 4,6\%$  dan lapisan bawah  $84,7 \pm 8,2\%$ . Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga viabilitas spermatozoa hasil sexing lebih tinggi daripada tris aminomethan kuning telur. Herdis dkk. (2008) menyatakan, pengencer andromed mengandung lesitin nabati sebanyak 6,76 g/100 ml dan fruktosa yang berperan sebagai sumber energi, sehingga spermatozoa dapat hidup dalam kondisi normal. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga viabilitas spermatozoa, meskipun secara statistik tidak signifikan. Pengencer CEP-2 memiliki kondisi yang sama seperti plasma cauda epididimis sapi, yang mampu menyimpan spermatozoa selama 45 hari dalam keadaan normal (Verberckmoes dkk., 2004; Asmarinah, 2010). Makromolekul yang berupa BSA dan kuning telur yang terdapat di dalam pengencer CEP-2 berperan melindungi dan mempertahankan permeabilitas dan integritas selubung lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Yamashiro dkk., 2006; Susilawati, 2002).

### **5.2.3 Persentase Abnormalitas Spermatozoa**

Abnormalitas spermatozoa dibedakan menjadi 2 macam yaitu abnormalitas primer dan abnormalitas sekunder. Abnormalitas primer terjadi ketika proses spermatogenesis, sedangkan abnormalitas sekunder terjadi setelah spermatogenesis hingga ejakulasi dan saat proses prosesing spermatozoa (Hafez dan Hafez, 2000). Abnormalitas yang ditemukan dalam penelitian ini termasuk abnormalitas tersier yang berupa kepala terpisah dengan ekor, ekor patah dan melengkung (Sujoko dkk., 2009). Bentuk spermatozoa abnormal dan normal terdapat pada Gambar 5.10.



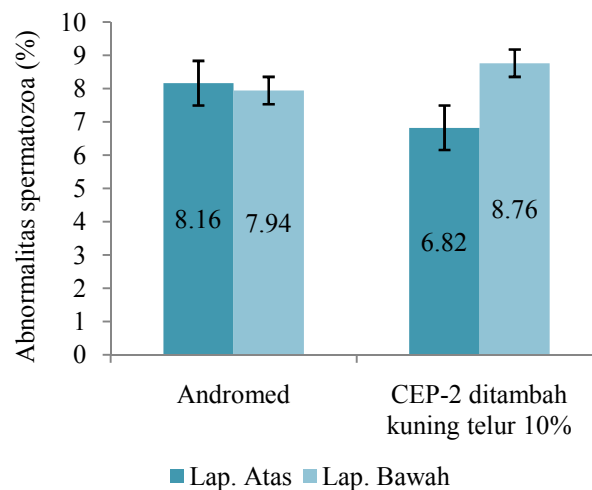
Gambar 5.10 Hasil Pengamatan Abnormalitas Spermatozoa

Keterangan A : spermatozoa normal  
B : spermatozoa abnormal

Data rata-rata persentase abnormalitas spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah terdapat pada Tabel 5.6 dan Gambar 5.11.

Tabel 5.6 Rata-Rata Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
8,16 ± 3,72	7,94 ± 3,60	6,82 ± 3,74	8,76 ± 4,26



Gambar 5.11 Rata-Rata Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga abnormalitas spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Perhitungan persentase viabilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 6. Persentase abnormalitas spermatozoa pada hasil penelitian ini diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah spermatozoa yang memiliki morfologi abnormal dibagi dengan jumlah

spermatozoa yang memiliki morfologi abnormal dan morfologi normal kemudian dikalikan 100%.

Rata-rata abnormalitas spermatozoa setelah sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berada pada kisaran normal, karena tidak lebih dari 20% (Toelihere, 1993). Jika jumlah spermatozoa abnormal tinggi maka akan menurunkan fertilitasnya (Hafez dan Hafez, 2000). Abnormalitas spermatozoa setelah sexing diduga terjadi karena proses sentrifugasi saat pencucian. Sentrifugasi saat pencucian dilakukan selama 5 menit dengan kecepatan 1500 rpm. Sentrifugasi mengakibatkan gesekan antar spermatozoa atau antara spermatozoa dengan medium maupun dinding tabung. Hal tersebut menyebabkan persentase abnormalitas dan kerusakan membran spermatozoa meningkat (Sujoko dkk., 2009).

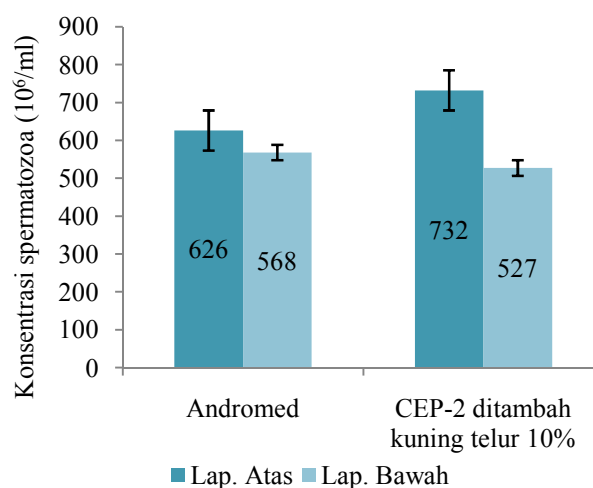
Abnormalitas spermatozoa hasil penelitian ini (Tabel 5.6) tidak jauh berbeda dengan hasil penelitian Pamungkas dkk. (2005), sexing menggunakan pengencer tris aminomethan kuning telur memperlihatkan abnormalitas spermatozoa pada lapisan atas 8,81% dan bawah 8,48%. Hal ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga abnormalitas spermatozoa hasil sexing sama seperti pengencer tris aminomethan kuning telur. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga abnormalitas spermatozoa, meskipun secara statistik tidak signifikan. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa selama proses sexing sehingga dapat meminimalisir abnormalitas spermatozoa. Andromed mengandung lesitin nabati dari kacang kedelai (Aires dkk., 2003), sedangkan kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein (Aku dkk., 2007). Mekanisme kerja lesitin dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu lesitin pada pengencer akan berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) (White, 1993). Lesitin dan lipoprotein di dalam kuning telur memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran sel spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002).

#### **5.2.4 Konsentrasi Spermatozoa**

Data rata-rata konsentrasi spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah seperti terdapat pada Tabel 5.7 dan Gambar 5.12.

Tabel 5.7 Rata-Rata Konsentrasi Spermatozoa Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Bawah (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Atas (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Bawah (10 <sup>6</sup> /ml)
626±204,52	568±158,38	732±241,15	527±141,27



Gambar 5.12 Rata-Rata Konsentrasi Spermatozoa Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dapat menjaga konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Sedangkan sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas lebih tinggi daripada lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P > 0,05$ . Perhitungan persentase vibilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 7.

Konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas yang diduga spermatozoa X lebih tinggi daripada lapisan bawah diduga spermatozoa Y (Tabel 5.7). Keadaan ini diduga karena perbedaan motilitas antara spermatozoa X dan Y yang menyebabkan ketidakmerataan distribusi spermatozoa. Spermatozoa X lebih lambat bergerak, spermatozoa X berusaha menembus gradien albumin (putih telur) pada lapisan tengah tetapi tidak mampu atau hanya sedikit yang dapat mencapai lapisan tengah, sehingga sebagian besar tetap berada pada lapisan atas. Sedangkan spermatozoa Y lebih motil, lebih mudah bergerak menembus gradien albumin (putih telur) pada lapisan tengah dan lapisan bawah, sehingga spermatozoa Y tersebar pada lapisan atas, tengah dan bawah. Ketidakmerataan distribusi spermatozoa juga dapat dikarenakan tingginya volume gradien sehingga spermatozoa sulit mencapai dasar tabung (Udrayana, 2009). Perbedaan konsentrasi albumin (putih telur) sebagai media sexing juga mempengaruhi konsentrasi spermatozoa. Lapisan atas memiliki konsentrasi albumin (putih telur) 10% sedangkan pada

lapisan tengah dan bawah memiliki konsentrasi albumin 30% dan 50%, sehingga terjadi peningkatan viskositas pengencer sehingga hanya spermatozoa yang memiliki motilitas tinggi yang mampu menembus lapisan bawah (Susilawati, 2002).

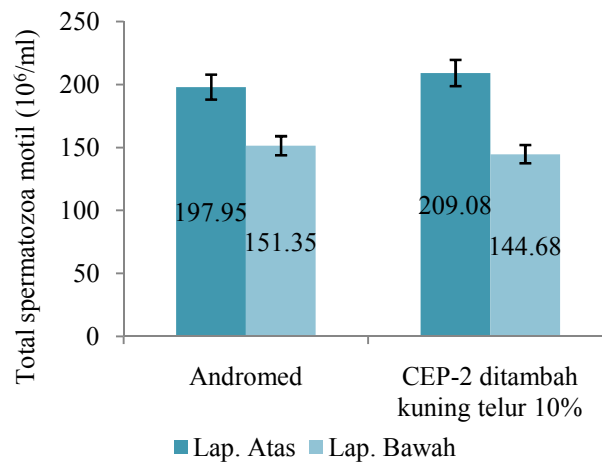
Penelitian Sianturi dkk. (2004), sexing menggunakan pengencer tris sitrat bufer ditambah kuning telur memperlihatkan hasil konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas  $640,5 \pm 331,2 \times 10^6/\text{ml}$  dan lapisan bawah  $522,2 \pm 312,9 \times 10^6/\text{ml}$ . Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga konsentrasi spermatozoa hasil sexing lebih tinggi daripada pengencer tris sitrat bufer ditambah kuning telur. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga konsentrasi spermatozoa, meskipun secara statistik tidak signifikan. Hal ini diduga karena fruktosa yang terkandung dalam pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Simmet, 2005; Verberckmoes dkk., 2004). Oleh karena itu spermatozoa memiliki energi yang cukup untuk bergerak dan untuk tetap menormalkan kondisi fisiologisnya dalam menembus gradien albumin (putih telur). Adanya kandungan lesitin dalam pengencer andromed dan kuning telur yang ditambahkan dalam pengencer CEP-2 yang berperan melindungi membran spermatozoa, sehingga permeabilitas dan integritas membran spermatozoa terjaga tetap normal. Dimana integritas membran diketahui berhubungan konsentrasi spermatozoa (Dobranic dkk., 2005). Kuning telur mengandung karbohidrat, mineral dan vitamin, sehingga spermatozoa mendapatkan sumber energi dalam jumlah yang cukup untuk mempertahankan motilitasnya yang akhirnya dapat menembus gradien albumin (putih telur) (Belitz dkk., 2009; Susilawati dkk., 2002). Spermatozoa dengan motilitas yang tinggi memiliki kemampuan memisah lebih besar dalam menembus medium albumin, sehingga menyebabkan konsentrasi spermatozoa juga tinggi (Susilawati, 2002).

### 5.2.5 Total Spermatozoa Motil

Data rata-rata total spermatozoa motil hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan bawah terdapat pada Tabel 5.8 dan Gambar 5.13.

Tabel 5.8 Rata-Rata Total Spermatozoa Motil Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas ( $10^6/\text{ml}$ )	Lap. Bawah ( $10^6/\text{ml}$ )	Lap. Atas ( $10^6/\text{ml}$ )	Lap. Bawah ( $10^6/\text{ml}$ )
197,95 $\pm$ 68,05	151,35 $\pm$ 39,29	209,08 $\pm$ 73,08	144,68 $\pm$ 40,62



Gambar 5.13 Rata-Rata Total Spermatozoa Motil Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dapat menjaga total spermatozoa motil pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Sedangkan sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga total spermatozoa motil pada lapisan atas lebih tinggi daripada lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P > 0,05$ . Perhitungan persentase vibilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 8.

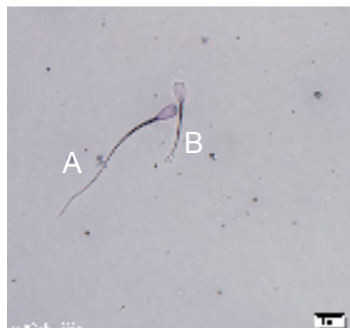
Total spermatozoa motil pada lapisan atas yang diduga sebagai spermatozoa X lebih tinggi daripada lapisan bawah yang diduga sebagai spermatozoa Y. Keadaan ini sesuai dengan tingginya konsentrasi spermatozoa pada lapisan atas dibandingkan dengan konsentrasi spermatozoa pada lapisan bawah. Hal ini dikarenakan perbedaan motilitas spermatozoa X dan Y, tingginya volume dan konsentrasi gradien albumin putih telur (Udrayana, 2009; Susilawati, 2002). Konsentrasi spermatozoa pada setiap lapisan merupakan faktor yang berpengaruh terhadap jumlah total spermatozoa, karena konsentrasi akan berpengaruh secara langsung terhadap perhitungan total spermatozoa motil (Udrayana, 2009). Hasil penelitian Udrayana (2009), sexing spermatozoa kambing dengan albumin BSA menggunakan pengencer andromed memperlihatkan total spermatozoa motil pada lapisan atas  $40,9 \pm 2,8 \times 10^6/\text{ml}$  dan lapisan bawah  $0,7 \pm 0,08 \times 10^6/\text{ml}$ . Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga total spermatozoa motil hasil sexing dengan albumin putih telur yang lebih tinggi daripada sexing dengan albumin BSA menggunakan pengencer andromed. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga total spermatozoa motil, meskipun secara statistik tidak signifikan. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga motilitas dan konsentrasi spermatozoa yang lebih besar dari standar SNI (Standar Nasional Indonesia), yaitu motilitas 40%

dan konsentrasi  $25 \times 10^6/\text{ml}$  sehingga pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat mempertahankan total spermatozoa motil dalam jumlah yang banyak.

### 5.3 Membran Spermatozoa Setelah Sexing dengan Gradien Albumin (Putih Telur) Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%

#### 5.3.1 Persentase Spermatozoa yang Memiliki Integritas Membran Baik

Pengamatan integritas membran spermatozoa dapat dilakukan menggunakan HOST. Cairan hypoosmotik masuk ke dalam spermatozoa melalui membran plasma, kemudian terjadi peningkatan volume cairan di dalam spermatozoa untuk mempertahankan keseimbangan cairan intraseluler spermatozoa dan lingkungan ekstraseluler. Spermatozoa yang memiliki membran normal (integritas membran baik), secara fungsional aktif pada pengujian HOST akan mengalami pembengkakan dengan masuknya air yang dimulai dari ujung ekor spermatozoa, sehingga ekornya terlihat melingkar atau bengkok. Sedangkan spermatozoa yang membrannya tidak normal (integritas membran buruk), secara fungsional tidak dapat menyesuaikan dengan tekanan osmotik, tidak mampu menahan air yang masuk, sehingga tidak mengembang (Dobranic dkk., 2005). Gambar spermatozoa hasil pengujian HOST terdapat pada Gambar 5.14.



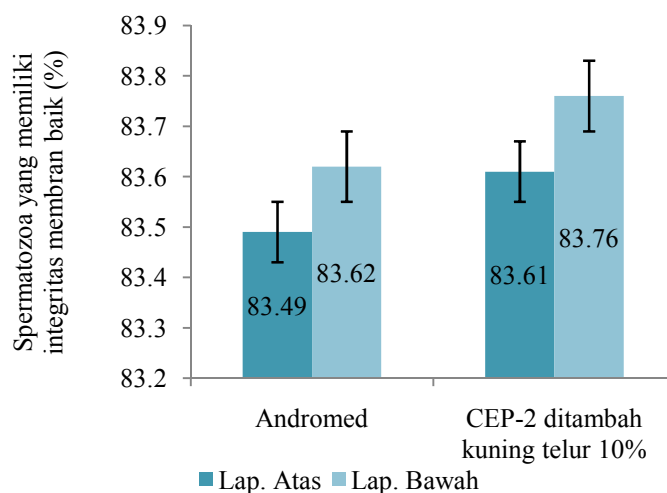
Gambar 5.14 Hasil Pengamatan Membran Spermatozoa Menggunakan HOST

Keterangan A : spermatozoa dengan membran tidak utuh  
B : spermatozoa dengan membran utuh

Data rata-rata spermatozoa yang memiliki integritas membran baik hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah seperti terdapat pada Tabel 5.9 dan Gambar 5.15.

Tabel 5.9 Rata-Rata Persentase Spermatozoa yang Memiliki Integritas Membran Baik Setelah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
$83,49 \pm 5,52$	$83,62 \pm 8,63$	$83,61 \pm 4,97$	$83,76 \pm 5,73$



Gambar 5.15 Rata-Rata Persentase Spermatozoa yang Memiliki Integritas Membran Baik Setelah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga jumlah spermatozoa yang memiliki integritas membran baik pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Perhitungan persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik terdapat pada Lampiran 9. Persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik pada hasil penelitian ini diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dibagi dengan jumlah spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa yang memiliki integritas membran buruk kemudian dikalikan 100%.

Spermatozoa yang memiliki integritas membran baik pada lapisan bawah lebih tinggi daripada lapisan atas (Tabel 5.9). Hal ini diduga karena spermatozoa yang sampai pada lapisan bawah adalah spermatozoa yang memiliki motilitas tinggi yang menandakan bahwa spermatozoa tersebut memiliki integritas membran dan metabolisme yang baik. Tingginya persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik pada lapisan bawah didukung dengan tingginya persentase viabilitas spermatozoa pada lapisan bawah. Hasil penelitian Afiati (2004) sexing menggunakan pengencer BO (*Brackett-Oliphant*) memperlihatkan spermatozoa yang memiliki membran plasma utuh pada lapisan atas 62,04% dan lapisan bawah 63,24%. Keadaan ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa selama proses sexing sehingga dapat menjaga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik lebih tinggi daripada pengencer BO. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, meskipun secara statistik tidak signifikan.



Kemampuan andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya lesitin yang terdapat pada andromed dan kuning telur yang ditambahkan pada CEP-2. Lesitin berperan melindungi membran spermatozoa selama proses sexing, sehingga integritas membran tetap baik. Menurut Sariozkan dkk. (2010) komponen yang berpengaruh pada lesitin kedelai adalah LDL yang mirip dengan kuning telur, yang berperan melindungi integritas fosfolipid penyusun membran. Sedangkan kuning telur yang ditambahkan pada pengencer CEP-2 mengandung LDL, HDL dan lesitin (*phospholipid*) (Belitz dkk., 2009) yang berfungsi melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Susilawati, 2002). Hasil penelitian Ducha (2012) memperlihatkan penambahan kuning telur pada pengencer CEP-2 dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan ROS sehingga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dapat dijaga tetap tinggi dan melindungi keutuhan ultrastruktur spermatozoa. Adanya makromolekul dalam kuning telur yang berupa lipid dan protein menjadi target oksidasi oleh ROS, sehingga ROS tidak mengoksidasi membran spermatozoa. Oleh karena itu, penggunaan CEP-2 ditambah kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan ROS yang ditunjukkan dengan kadar MDA dan SOD (*super oxide dismutase*) yang tinggi.

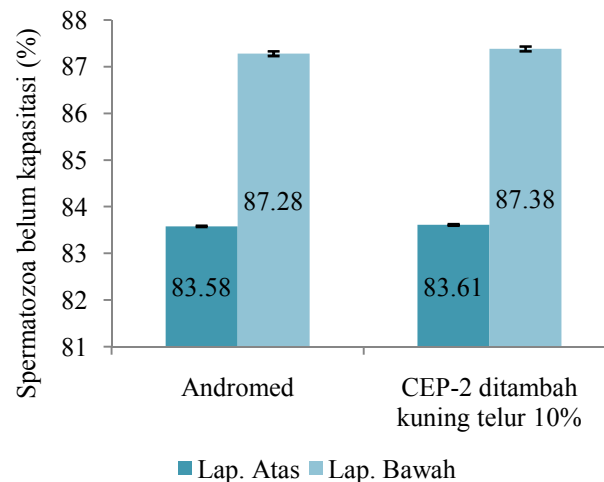
LDL yang terkandung dalam kuning telur mampu melindungi dan menstabilkan membran spermatozoa. LDL dapat berinteraksi (berikatan atau menempel) dengan membran plasma sehingga mampu melindungi membran plasma spermatozoa (Pillet dkk., 2011). Fosfatidilkolin (lesitin) merupakan salah satu komponen penyusun LDL pada kuning telur yang dapat bergabung dengan membran plasma tanpa mempengaruhi membran plasma (Ricker dkk., 2006). LDL dapat mengikat BSP (*bovine seminal plasma*) yang terkandung dalam seminal plasma. BSP merupakan protein yang dapat menyebabkan hilangnya kolesterol dan fosfolipid dari membran spermatozoa, keadaan tersebut akan menginduksi terjadinya kapasitasi. Oleh karena itu, penambahan kuning telur dalam pengencer menyebabkan interaksi antara LDL dengan BSP sehingga membuat membran spermatozoa stabil (Bergeron dan Manjunath, 2006).

### **5.3.2 Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi**

Data rata-rata persentase spermatozoa belum kapasitasi sesudah sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan lapisan bawah seperti terdapat pada Tabel 5.10 dan Gambar 5.16.

Tabel 5.10 Rata-Rata Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
83,58 ± 1,62	87,28 ± 0,09	83,61 ± 4,65	87,38 ± 4,71



Gambar 5.16 Rata-Rata Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dapat menjaga spermatozoa belum kapasitasi pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Sedangkan sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga spermatozoa belum kapasitasi pada lapisan atas lebih tinggi daripada lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P > 0,05$ . Perhitungan persentase viabilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 10. Persentase spermatozoa belum kapasitasi pada hasil penelitian ini diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah spermatozoa belum kapasitasi dibagi dengan jumlah spermatozoa belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom kemudian dikalikan 100%.

Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga spermatozoa belum kapasitasi setelah sexing pada lapisan atas lebih rendah daripada lapisan bawah (Tabel 5.10). Data tersebut didukung dengan data spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, pada lapisan atas lebih rendah daripada lapisan bawah. Rendahnya persentase spermatozoa belum kapasitasi pada lapisan atas disebabkan karena spermatozoa telah mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom. Hasil penelitian Udrayana (2009), sexing dengan gradien albumin BSA menggunakan pengencer andromed memperlihatkan spermatozoa kambing belum kapasitasi pada lapisan atas 3% dan lapisan bawah 4,1%. Keadaan tersebut menunjukkan bahwa sexing dengan albumin putih telur menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga spermatozoa belum kapasitasi yang lebih tinggi daripada sexing dengan

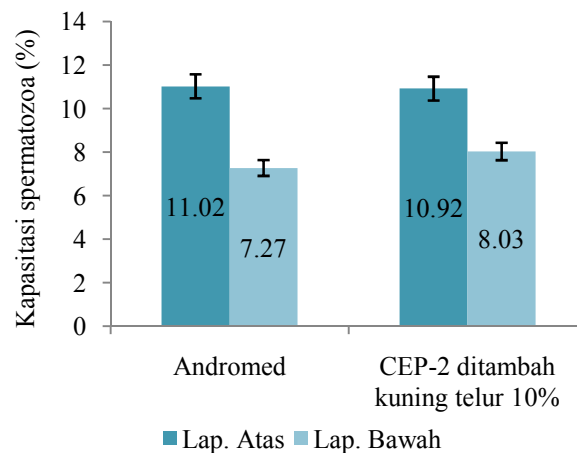
albumin BSA menggunakan pengencer andromed. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa yang ditunjukkan dengan tingginya persentase spermatozoa belum kapasitasi. Spermatozoa belum kapasitasi menandakan bahwa spermatozoa tersebut memiliki membran yang masih utuh dan normal, artinya tidak mengalami perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid penyusun membran plasma. Spermatozoa belum kapasitasi memiliki membran yang stabil, tidak terjadi hiperpolarisasi membran dan perubahan aliran ion (Felix dkk., 2004).

Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga spermatozoa belum kapasitasi, meskipun secara statistik tidak signifikan. Pengencer andromed mampu melindungi membran spermatozoa diduga karena adanya kandungan lesitin nabati yang berperan mempertahankan dan melindungi integritas membran spermatozoa (Hammadeh dkk., 2001). Pengencer CEP-2 memiliki konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  yang tinggi, tetapi hal tersebut tidak menyebabkan terjadinya kapasitasi, hiperaktivasi motilitas dan reaksi akrosom yang dapat membatasi daya hidup spermatozoa. Karena tingginya konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  bersamaan dengan tingginya konsentrasi ion  $\text{Mg}^{2+}$  yang dapat menghambat  $\text{Ca}^{2+}$  dalam menginduksi kapasitasi (Verberckmoes dkk., 2004). Selain itu, terjadinya kapasitasi membutuhkan lingkungan yang bersifat basa dan pH intraseluler tinggi (Felix dkk., 2004) sedangkan pH pada pengencer CEP-2 bersifat sedikit asam yaitu 6,6. Hasil penelitian Verberckmoes dkk. (2004) menunjukkan penyimpanan spermatozoa dengan pengencer CEP-2 selama 6 hari pada suhu  $5^{\circ}\text{C}$  tidak menyebabkan terjadinya hiperaktivasi motilitas dan kapasitasi. Kuning telur yang ditambahkan dalam CEP-2, berperan sebagai makromolekul yang mengandung substansi protektif berupa lesitin dan lipoprotein yang berfungsi mempertahankan dan melindungi membran spermatozoa ketika proses sexing (Susilawati, 2002). Kuning telur juga berperan membantu mencegah kapasitasi dini spermatozoa (Delgado dkk., 2009).

### 5.3.3 Persentase Kapasitasi Spermatozoa

Data rata-rata persentase kapasitasi spermatozoa sesudah sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan bawah terdapat pada Tabel 5.11 dan Gambar 5.17.

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
$11,02 \pm 0,87$	$7,27 \pm 2,42$	$10,92 \pm 3,28$	$8,03 \pm 2,28$



Gambar 5.17 Rata-Rata Persentase Kapasitasi Spermatozoa Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga kapasitas spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Perhitungan persentase vilitas spermatozoa terdapat pada Lampiran 11. Persentase kapasitas spermatozoa pada hasil penelitian ini diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah spermatozoa yang mengalami kapasitas dibagi dengan jumlah spermatozoa belum kapasitas, kapasitas dan reaksi akrosom kemudian dikalikan 100%.

Terjadinya kapasitas spermatozoa hasil sexing disebabkan karena adanya proses sentrifugasi saat pencucian. Sentrifugasi saat pencucian dilakukan dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit (Susilawati, 2003). Hasil penelitian Safitri (2011) menunjukkan, sentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit menyebabkan kapasitas spermatozoa kambing sebesar  $41,67 \pm 5,16\%$ . Proses sentrifugasi menyebabkan hilangnya *decapacitation factors* (DF) dari membran spermatozoa. Faktor dekapasitasi yang terkandung dalam plasma semen, berperan melindungi stabilitas membran spermatozoa dan mengatur aktivitas  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase yang terdapat pada membran kepala spermatozoa. Faktor dekapasitasi mengaktifkan  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase untuk mengatur konsentrasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler agar tetap rendah sehingga proses kapasitas dan reaksi akrosom tidak berlangsung (Fraser, 1998). Hilangnya faktor dekapasitasi akibat sentrifugasi menyebabkan spermatozoa mengalami kapasitas dan reaksi akrosom (Safitri, 2011).

Rendahnya persentase kapasitas spermatozoa hasil penelitian ini (Tabel 5.11) menandakan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran spermatozoa selama proses sexing. Hal ditunjukkan dengan membran yang stabil dan pengaturan regulasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  yang berjalan normal, sehingga kapasitas spermatozoa dapat diminimalisir. Pengencer andromed lebih baik daripada pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dalam menjaga kapasitas spermatozoa. Kemampuan pengencer andromed melindungi

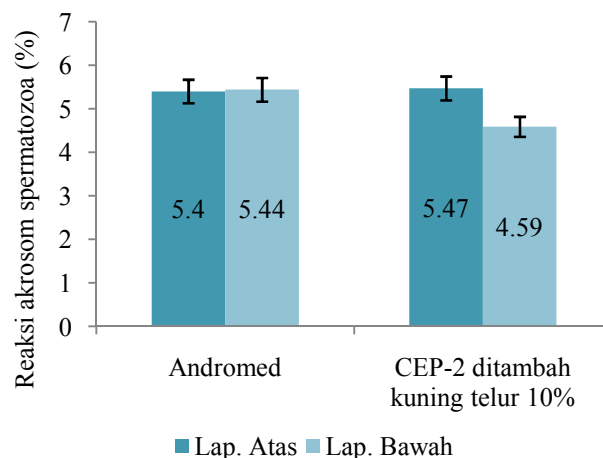
membran spermatozoa diduga karena adanya lesitin nabati yang mampu mempertahankan dan melindungi integritas selubung lipoprotein spermatozoa (Hammadeh dkk., 2001). Mekanisme kerja lesitin dalam mempertahankan kualitas spermatozoa yaitu lesitin pada pengencer berikatan dengan membran plasma (menyelimuti membran plasma) sehingga mampu mempertahankan kestabilan membran (White, 1993). BSA yang terkandung dalam pengencer CEP-2 berperan mencegah masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol dan melindungi membran spermatozoa, sehingga meminimalisir spermatozoa yang kapasitasi dan reaksi akrosom dini. Menurut Landim-Alvarenga dkk. (2004) BSA merupakan makromolekul yang berperan mengikat  $\text{Ca}^{2+}$ , mencegah masuknya  $\text{Ca}^{2+}$  yang berlebihan ke sitosol, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan  $\text{Ca}^{2+}$  melewati membran dan menghambat akumulasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa, sehingga viabilitas, motilitas dan spermatozoa belum kapasitasi dapat dipertahankan tetap tinggi. Penggunaan CEP-2 dengan suplementasi kuning telur dapat melindungi spermatozoa terhadap serangan ROS, sehingga dapat mempertahankan spermatozoa belum kapasitasi, meminimalisir kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa (Ducha, 2012).

#### 5.3.4 Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa

Data rata-rata persentase reaksi akrosom spermatozoa sesudah sexing dengan gradien albumin (putih telur) menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas dan bawah terdapat pada Tabel 5.12 dan Gambar 5.18.

Tabel 5.12 Rata-Rata Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Sesudah Sexing

Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%	
Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
5,40 ± 1,25	5,44 ± 2,39	5,47 ± 1,80	4,59 ± 2,46



Gambar 5.18 Rata-Rata Persentase Reaksi Akrosom Spermatozoa Sesudah Sexing

Sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga reaksi akrosom spermatozoa pada lapisan atas sama seperti lapisan bawah, dengan derajat kepercayaan  $P < 0,05$ . Perhitungan persentase reaksi akrosom spermatozoa terdapat pada Lampiran 12. Persentase reaksi akrosom spermatozoa pada hasil penelitian ini diperoleh dari hasil pembagian antara jumlah reaksi akrosom spermatozoa dibagi dengan jumlah spermatozoa belum kapasitasi, kapasitasi dan reaksi akrosom kemudian dikalikan 100%.

Terjadinya reaksi akrosom spermatozoa hasil sexing dikarenakan adanya proses sentrifugasi yang menyebabkan perubahan fungsi membran akibat berkurangnya membran plasma utuh (Afiati, 2004). Hasil penelitian Safitri (2011) sentrifugasi terhadap spermatozoa kambing dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit menyebabkan terjadinya reaksi akrosom sebesar  $28.50 \pm 3.21\%$ . Menurunnya fungsi membran sebagai kontrol terhadap sistem transport akibat sentrifugasi menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap ion  $\text{Ca}^{2+}$  sehingga konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler meningkat. Konsentrasi ion  $\text{Ca}^{2+}$  intaseluler yang tinggi diperlukan untuk meningkatkan fosforilasi protein tirosin untuk memodulasi gerakan flagellum spermatozoa (Asmarinah, 2010; Naz dan Rajesh, 2004) dan penggabungan antara membran plasma dengan membran luar akrosom, sehingga terjadi reaksi akrosom (Landim-Alvarenga dkk., 2004).

Rendahnya persentase reaksi akrosom spermatozoa hasil sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% (Tabel 5.12) menandakan bahwa sebagian besar spermatozoa masih belum mengalami reaksi akrosom yang berarti spermatozoa masih memiliki tudung akrosom atau membran akrosom masih utuh. Keadaan ini menandakan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi membran akrosom spermatozoa. Penelitian Sianturi dkk. (2004) sexing dengan albumin putih telur menggunakan pengencer tris sitrat bufer ditambah 20% kuning telur memperlihatkan hasil spermatozoa yang memiliki tudung akrosom utuh pada lapisan atas  $77,9 \pm 4,2\%$  dan lapisan bawah  $79,0 \pm 3,9\%$ . Hal ini menunjukkan bahwa pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat melindungi tudung akrosom spermatozoa sama seperti pengencer tris sitrat buffer ditambah 20% kuning telur.

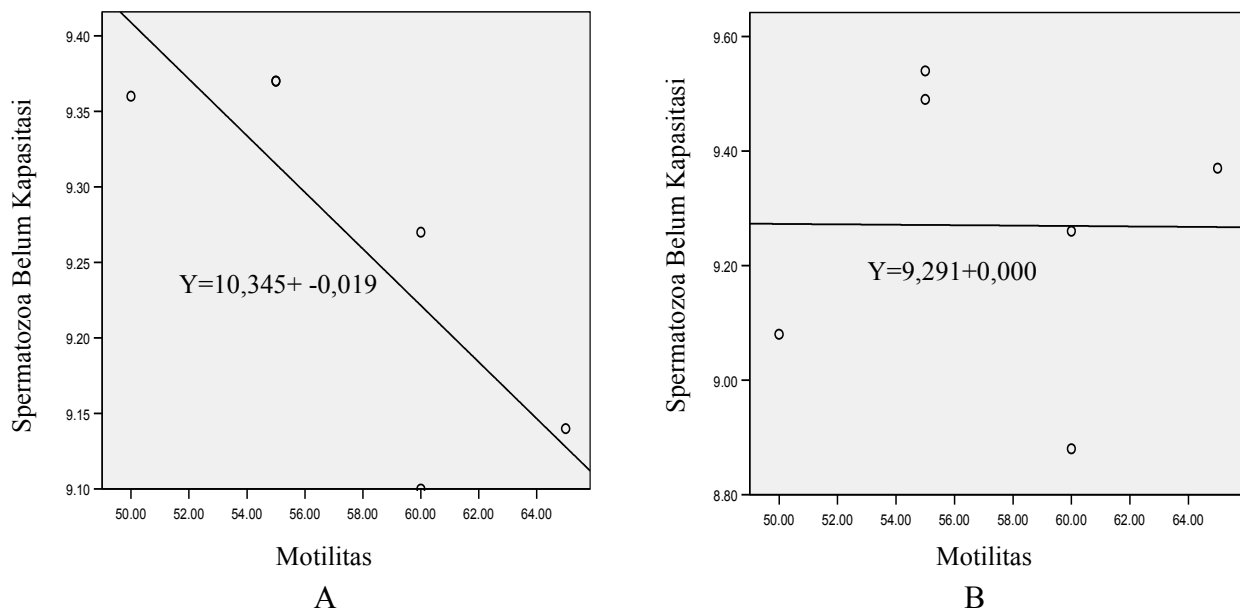
Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga reaksi akrosom spermatozoa, meskipun secara statistik tidak signifikan. Pengencer andromed mampu melindungi membran akrosom spermatozoa hasil sexing diduga karena adanya kandungan lesitin kedelai yang mampu melindungi membran spermatozoa (Hammadeh dkk., 2001). Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% mampu melindungi tudung akrosom spermatozoa disebabkan karena kuning telur mengandung lesitin dan

lipoprotein yang memiliki melekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas selubung lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002). Albumin yang terkandung dalam BSA yang terdapat pada pengencer CEP-2, memiliki kemampuan dalam mengikat  $\text{Ca}^{2+}$  pada membran plasma. Oleh karena itu, memungkinkan membran untuk lebih efektif dalam mengatur pergerakan  $\text{Ca}^{2+}$  melewati membran dan menghambat akumulasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler ke tingkat yang toksik bagi spermatozoa (Landim-Alvarenga dkk., 2004). Akumulasi  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler yang berlebihan perlu dikurangi karena peningkatan  $\text{Ca}^{2+}$  intraseluler dua kali lipat dibandingkan kondisi normal menyebabkan terjadinya penurunan motilitas, yaitu penurunan kecepatan dan gerak progresif spermatozoa (Eddy, 2006). Albumin yang terdapat dalam serum bertindak sebagai antioksidan yang mampu menghambat peroksidasi lipid penyusun membran sel (Alvarez dan Storey, 1995). BSA dapat mengurangi radikal bebas yang dibentuk oleh stress oksidatif dan melindungi integritas membran spermatozoa. Pengencer yang ditambahkan BSA dapat melindungi membran akrosom dan integritas membran spermatozoa (Uysal dan Bucak, 2007). Hasil penelitian Yamashiro dkk. (2006) memperlihatkan, pengencer yang ditambahkan BSA dapat menjaga motilitas dan keutuhan membran akrosom spermatozoa setelah dibekukan.

#### **5.4 Korelasi Antara Persentase Motilitas dengan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi pada Lapisan atas dan Lapisan Bawah**

Pengamatan motilitas spermatozoa merupakan parameter utama kedua dan digunakan untuk mengetahui kemampuan spermatozoa dalam melakukan penetrasi terhadap korona radiata dan zona pelusida sel telur. Pengamatan motilitas spermatozoa bersifat subjektif, sehingga data motilitas perlu didukung dengan data viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi spermatozoa (Susilawati, 2011). Spermatozoa yang memiliki motilitas progresif menandakan bahwa spermatozoa tersebut hidup dan memiliki morfologi normal, memiliki metabolisme yang baik dan simpanan energi dalam bentuk ATP intraseluler. Oleh karena itu, parameter motilitas spermatozoa dapat mewakili parameter viabilitas, abnormalitas dan konsentrasi spermatozoa. Spermatozoa belum kapasitasi menandakan bahwa spermatozoa tersebut belum mengalami kapasitasi dan reaksi akrosom. Spermatozoa belum kapasitasi memiliki membran plasma dan membran akrosom yang masih utuh dan normal, artinya integritas membran normal, membran tidak mengalami perubahan distribusi dan komposisi lipid dan fosfolipid (Felix dkk., 2004). Oleh karena itu, parameter spermatozoa belum kapasitasi dapat mewakili parameter spermatozoa yang memiliki integritas membran baik, kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa.

Hasil penelitian menunjukkan motilitas dan spermatozoa belum kapasitasi setelah sexing menggunakan pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% mengalami penurunan. Untuk mengetahui apakah terdapat korelasi antara penurunan motilitas dengan penurunan spermatozoa belum kapasitasi, terutama untuk mengetahui pola hubungan yang modelnya belum diketahui maka dilakukan analisis regresi korelasi untuk menganalisis hubungan tersebut. Grafik hasil analisis regresi korelasi antara integritas membran dengan motilitas seperti Gambar 5.19.



Gambar 5.19 Korelasi Antara Motilitas dengan Spermatozoa Belum Kapasitasi pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah

Keterangan A : sexing menggunakan pengencer andromed

B : sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%

Gambar 5.19 bagian A memperlihatkan korelasi negatif antara motilitas (X) dengan spermatozoa belum kapasitasi (Y) hasil sexing menggunakan pengencer andromed. Artinya setiap kenaikan motilitas spermatozoa menyebabkan jumlah spermatozoa belum kapasitasi menurun. Gambar 5.19 bagian B memperlihatkan korelasi positif antara motilitas dengan spermatozoa belum kapasitasi hasil sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%. Artinya setiap kenaikan motilitas menyebabkan jumlah spermatozoa yang belum kapasitasi meningkat. Hasil uji regresi antara motilitas dengan integritas membran spermatozoa terdapat pada Lampiran 13.

Korelasi negatif yang dibentuk antara motilitas dengan spermatozoa belum kapasitasi hasil sexing dengan pengencer andromed menunjukkan bahwa pengencer andromed dapat melindungi



motilitas spermatozoa tetapi kurang mampu melindungi spermatozoa belum kapasitas, yang artinya pengencer andromed kurang mampu melindungi membra spermatzooa. Hal tersebut diduga karena krioprotektan yang terkandung dalam andromed kurang mampu melindungi spermatozoa. Andromed mengandung krioprotektan intraseluler berupa gliserol yang berperan melindungi membran spermatozoa saat pembekuan akibat terjadinya *cold shock* (Susilawati, 2011). Meskipun gliserol dapat berperan sebagai penghasil fruktosa, lebih sedikit asam laktat yang terbentuk dan spermatozoa menunjukkan aktivitas yang optimum (Aires dkk., 2003), tetapi hal tersebut hanya dapat menjaga motilitas dan kurang mampu menjaga membran spermatozoa. Korelasi positif yang dibentuk antara motilitas spermatozoa dengan spermatozoa belum kapasitas hasil sexing dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% menunjukkan bahwa pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga motilitas dan spermatozoa belum kapasitas. Keadaan ini diduga karena bahan-bahan dan krioprotektan yang terkandung dalam CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat melindungi motilitas dan membran spermatozoa. Fruktosa dalam pengencer CEP-2 berperan sebagai sumber energi bagi spermatozoa (Verberckmoes dkk., 2004). Kuning telur yang ditambahkan dalam CEP-2 bereran sebagai krioprotektan ekstraseluler (Susilawati, 2011). Kuning telur mengandung lesitin dan lipoprotein yang memiliki molekul-molekul besar yang tidak dapat menembus membran spermatozoa dan berfungsi untuk melindungi dan mempertahankan integritas lipoprotein penyusun membran spermatozoa (Susilawati, 2002).

Korelasi negatif yang dibentuk antara motilitas dengan spermatozoa belum kapasitas hasil sexing menggunakan pengencer andromed tergolong tinggi yaitu sebesar 80,8% (Lampiran 13, Tabel *Model Summary*, berdasarkan nilai R). Tingginya korelasi tersebut menandakan bahwa peningkatan motilitas menyebabkan jumlah spermatozoa belum kapasitas menurun. Keadaan ini disebabkan karena spermatozoa telah mengalami kapasitas 9,14% (Tabel 5.11) dan reaksi akrosom 5,42% serta adanya faktor lain mempengaruhi kedua parameter tersebut (Tabel 5.12). Motilitas berpengaruh sebesar 65,3% (Lampiran 13, Tabel *Model Summary*, berdasarkan nilai R *square*) terhadap spermatozoa belum kapasitas dan 34,7% dipengaruhi oleh faktor-faktor lain selain motilitas. Korelasi positif yang dibentuk antara motilitas dengan spermatozoa belum kapasitas hasil sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% tergolong sangat rendah yaitu sebesar 0,8% (Lampiran 13, Tabel *Model Summary*, berdasarkan nilai R). Keadaan ini menunjukkan bahwa tingginya motilitas belum tentu menyebabkan tingginya jumlah spermatozoa belum kapasitas, karena spermatozoa telah mengalami kapsitasi 9,47% (Tabel 5.11) dan reaksi akrosom 5,03% (Tabel 5.12) serta adanya faktor lain mempengaruhi kedua parameter tersebut. Motilitas berpengaruh sebesar 0% (Lampiran 13, Tabel *Model*

*Summary*, berdasarkan nilai *R square*) terhadap spermatozoa belum kapasitasi dan 100% dipengaruhi oleh faktor-faktor lain selain motilitas. Faktor-faktor lain yang berpengaruh dan berkorelasi terhadap motilitas dan spermatozoa belum kapasitasi adalah viabilitas (Bohlooli dkk., 2012), abnormalitas, keutuhan membran akrosom (Sharma dkk., 2012) integritas dan permeabilitas membran (Rahmah, 2007; Salicioni dkk., 2007). Adanya korelasi antara motilitas, viabilitas, keutuhan membran akrosom dan keutuhan membran plasma karena semua parameter tersebut berhubungan dengan integritas membran (Brito dkk., 2003).

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1 Kesimpulan**

1. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga kualitas spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur). Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga motilitas, viabilitas, konsentrasi dan total spermatozoa motil tetap tinggi, sedangkan abnormalitas rendah.
2. Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga membran spermatozoa hasil sexing dengan gradien albumin (putih telur). Pengencer andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% dapat menjaga spermatozoa yang memiliki integritas membran baik dan spermatozoa belum kapasitasi tetap tinggi, sedangkan kapasitasi dan reaksi akrosom spermatozoa rendah.
3. Motilitas spermatozoa hasil sexing menggunakan pengencer andromed berkorelasi negatif dengan spermatozoa belum kapasitasi. Sedangkan motilitas spermatozoa hasil sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% berkorelasi positif dengan spermatozoa belum kapasitasi.
4. Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% lebih baik daripada pengencer andromed dalam menjaga kualitas dan membran spermatozoa setelah sexing dengan gradien albumin (putih telur).

#### **6.2 Saran**

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan kualitas spermatozoa hasil sexing dengan kemampuan fertilisasi.
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut penggunaan CEP-2 ditambah kuning telur 10% sebagai pengencer dalam pembekuan spermatozoa hasil sexing.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afiati, F. 2004. Proporsi dan Karakteristik Spermatozoa X dan Y Hasil Separasi Kolom Albumin. *Jurnal Media Peternakan*. 27(1):16-20.
- Agarwal, A., R.A. Saleh, & M.A. Bedaiwy. 2003. Role of Reactive Oxygen Species in The Pathophysiology of Human Reproduction. *Fert and Steril*. 79:829-43.
- Aires, V.A., K.D. Hinsch, F.M. Schloesser, F.M. Schloesser, K. Bogner, S.M. Schloesser & E. Hinsch. 2003. In Vitro and In Vivo Comparison of Egg Yolk-Based and Soybean Lecithin Based Extenders for Cryopreservation of Bovine Semen. *Theriogenology*. 60(2):269-279.
- Aku, A.S., N. Sandiah & P.D. Sadsoeitoeboen. 2007. Manfaat Lesitin Nabati pada Preservasi dan Kriopreservasi Semen: Suatu Kajian Pustaka. *Journal Animal Production*. 9(1):49-52.
- Alvarez, F.J., D.E. Dewey, Harrington, D.A. & R.E.W. Fyffe. 1997. Cell-Type Specific Organization of Glycine Receptor Clusters in The Mammalian Spinal Cord. *Journal of Comparative Neurology*. 379:150-170.
- Alvarez, J.G., & B.T. Storey. 1995. Differential Incorporation of Fatty Acid Into and Peroxidative Loss of Fatty Acid From Phospholipid of Human Spermatozoa. *Journal Mol Reprod Dev*. 42:334-345.
- Asmarinah. 2010. Peran Molekul Kanal Ion pada Fungsi Spermatozoa. *Majalah Kedokteran Indonesia*. 60(8):374-380.
- Baldi, E., M. Luconi, L. Bonaccorsi, C. Krausz & G. Forti. 1996. Human Sperm Activation During Capacitation and Acrosome Reaction: Role of Calcium, Protein Phosphorylation and Lipid Remodelling Pathways. *Frontiers in Bioscience*. 1:189-205.
- Belitz, H.D., W., Grosch & P., Schieberle. 2009. Structure, Physical Properties and Composition Eggs. *Food Chemistry*:546-561.
- Bergeron A. & P., Manjunath. 2006. New Insights Towards Understanding The Mechanisms of Sperm Protection by Egg Yolk and Milk. *Journal Mol Reprod Dev*. 73:1338-1344.
- Bohllooli, S., F. Cedden, S. Bozoğlu, S. Razzaghzadeh & J. Pishjang. 2012. Correlation Between Conventional Sperm Assay Parameters in Cryopreserved Ram Semen. *Annals of Biological Research*. 3(2):884-889.
- Brandeis, V.T & M.T., Manuel. 1993. Effect of Four Method of Sperm Preparations and The Motile, Concentration, Morphology and Acrosome Status of Recovered Sperm From Normal Semen Samples. *Journal of Ass Reprod Gen*. 10(6):409-416.
- Brito, L.F., A.D. Barth, S. Bilodeau-Goessel, P.L. Panich dan J.P. Kastelic. 2003. Comparison of Methods to Evaluate Plasmalemma of Bovine Sperm and Their Relationship with In-Vitro Fertilization Rate. *Theriogenology*. 60:1539-1551.
- Campbell, N.A., J.B. Reece & L.G. Mitchell. 2002. Biology. 5<sup>th</sup> Edition. Alih bahasa oleh Lestri R., E.I.M. Adil & N. Anita. 2002. Erlangga. Jakarta.
- Cooper, G.M. and R.E. Hausman. 2004. *The Cell: A Molecular Approach*. 3<sup>th</sup> Edition. ASM Press. Washington.

- Correa, J.R. & P.M. Zavos. 1994. The Hypoosmotic Swelling Test: Its Employment as an Assay to Evaluate The Functional Integrity of The Frozen-Thawed Bovine Sperm Membrane. *Theriogenology*. 42:351-360.
- Dauphas S., Beaumal V., Riaublanc A. & Anton M. 2006. Hen Egg Yolk Low-Density Lipoproteins film Spreading at The Air-Water and Oil-Water Interfaces. *Journal Agric Food Chem*.54:33-37.
- De Pauw I., A. Van Soom, S. Verberckmoes & A. de Kruif. 2003. Suitability of Sperm Function Tests for The Evaluation of Sperm Quality and Bull Fertility. *Theriogenology*.19-38.
- Delgado, P.A., T.D. Lester & R.W. Rorie. 2009. Effect of a Low-Sodium, Choline-Based Diluent on Viability of Bovine Sperm Stored at Refrigerator Temperatures. *Arkansas Animal Science Department Report*.77-79.
- Dobranic, T., M. Samardzija, M. Cergolj & N. Prvanovic. 2005. Determination of Membrane Integrity of Canine Sperm. *Journal Veterinarski Arhiv*. 75:23-30.
- Ducha, N. 2012. Suplementasi Kuning Telur dalam Pengencer CEP-2 terhadap Kualitas dan Integritas Membran Spermatozoa Sapi Limousin Selama Penyimpanan pada Suhu 4-5°C. Program Studi Ilmu Ternak, Pascasarjana Fakultas Peternakan, Universitas Brawijaya. Laporan Seminar Hasil Penelitian Disertasi.
- Eddy, E.M. 2006. The Spermatozoon. *cit.* Knobil & Neill's. Physiology of Reproduction. 3<sup>th</sup> Editions. Volume 1. Elsevier Inc. All rights reserved: 3-65.
- Esteves, S., Sharma, R., Thomas, A., & Agarwal, A. 2000. Effect of Swim-up Sperm Washing and Subsequent Capacitation on Acrosome Status and Functional Membran Integrity of Normal Sperm. Department of Urology The Cleveland Clinic Foundation Cleveland, Ohio.
- Felix, R., I. Lo'pez-Gonza'lez, C. Mun'oz-Garay & A. Darszon. 2004. Ion Channels and Sperm Function. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 32:407-431.
- Florman, H.M. & T. Ducibella. 2006. Fertilization in Mammals. In Physiology of Reproduction. 3<sup>th</sup> Editions. Volume 1. Knobil & Neill's. Elsevier Inc. All rights reserved:55-112.
- Fraser L.R., Ebeydeera, L.R. & Niwa, K. 1995. Ca<sup>++</sup> Regulation Mechanism That Modulate Bull Sperm Capacitation and Acrosomal Exocytose as Determined by Chlortetracycline Analysis. *Mol-Reprod Dev*. 40:233-241.
- Fraser, L.R. 1998. Sperm Capacitation and The Acrosome Reaction. *Human Reproduction*. 13:9-19.
- Garner, D.L. & E.S.E. Hafez. 2008. Spermatozoa and Seminal Plasma. In Reproduction in Farm Animals. 7<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. USA:96-110.
- Hafez, E.S.E. & B. Hafez. 2000. X and Y Chromosome Bearing Spermatozoa. In Reproduction in Farm Animal. 6<sup>th</sup> Edition. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia:440-443.
- Hammadeh M.E., T. George, P. Rosenbaum & W. Schmidt. 2001. Association Between Freezing Agent and Acrosome Damage of Human Spermatozoa From Sub Normal and Normal Sperm. *Journal Andrologia*. 32:331-336.

- Herdis, M. Surachman, Yulnawati, M. Rizal & H. Maheshwari. 2008. Viabilitas dan Keutuhan Membran Plasma Spermatozoa Epididimis Kerbau Belang pada Penambahan Maltosa dalam Pengencer Andromed®. *J. Indon. Trop. Anim. Agric.* 33(2):101-106.
- Herold, F.C., J.E. Aurich & D. Gerber. 2004. Epididymal Sperm from The African Buffalo (*Syncerus caffer*) Can be Frozen Successfully with Andromedâ and Triladylâ but The Addition of Bovine Seminal Plasma is Detrimental. *Theriogenology*. 61:715-724.
- Huang, J., G. Wang & L. Kong. 2009. Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{HCO}_3^-$  on Capacitation, Hyperactivation and Protein Tyrosine Phosphorylation in Guinea Pig Spermatozoa. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22(2):181-186.
- Kaul, Sharma, Singh, & K.K, Gandhi. 2001. Capacitation and Acrosome Reaction in Buffallo Bull Spermatozoa Assessed by Chlortetracycline and Pisum Sativum Agglutinin Fluorescence Assay. *Theriogenology*. 55:1457-1468.
- Landim-Alvarenga, F.C., J.K. Graham, M.A. Alvarenga & E.L. Squires. 2004. Calcium Influx Into Equine and Bovine Spermatozoa During In Vitro Capacitation. *Journal Animal Reproductive*. 1(1):96-105.
- Li-Chan, E.C.Y., W.D. Powrie, & S. Nakai. 1995. The Chemistry of Eggs and Egg Products. In Egg Science and Technology, Eds. W.J. Stadelman and O.J. Cotterill. 4<sup>th</sup> Editions. The Haworth Press, Inc., New York:105-176.
- Mubarakati, N.J. 2009. Perubahan Integritas Membran, Kapasitasi dan Reaksi Akrosom Spermatozoa Kambing Setelah Proses Sexing dengan Menggunakan Percoll pada Gradien yang Berbeda. Program Pasca Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengelahuan Alam Universitas Brawija. Malang. Tesis.
- Nabiev, D., Giles, H. Scheider, E. Mahibir, K. Wimmers, A. Ponsuksili, H. Koll & K. Schellader. 2003. Comparison of Andromed and Tris Egg Yolk Extender Bovine Post Thawing Sperm Function Parameter and In Vitro Fertility. *Theriogenology*. 38:209-222.
- Nainar, M.A., B.M. Easwarman & F., Ulnathan. 1993. Studies on No-Motile Spermatozoa (Static Semen) in Buffalo Bull Semen. *Indian Vet Journal*. 67:133-135.
- Naz, R.K. & P.B. Rajesh. 2004. Review Role of Tyrosine Phosphorylation in Sperm Capacitation/Acrosome Reaction. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2(75):1-12.
- Nehring, H. & L. Rothe. 2003. Insemination of Cryopreserved of Bull Semen Portions With Reduced Sperm Number After Freezing and Thawing is Related to Cellular Injury. *Journal Biology of Reproduction*. 71:973-978.
- Ollero, M., E. Guzman, M.C. Lopez, R.K. Sharma, A. Agarwal, K. Larson, D. Evanson, A.J. Thomas & J.G. Alvarez. 2001. Characterization on Subset of Human Spermatozoa at Different Stages of Maturation:Implications in The Diagnosis and Treatment of Male Infertility. *Journal Human Reproductive*. 16(9):1912-1921.
- Padrik, P., T. Hallap, T. Kaart, T. Bulitko dan Ü. Jaakma. 2012. Relationships Between The Results of Hypo-Osmotic Swelling Tests, Sperm Motility, and Fertility in Estonian Holstein Dairy Bulls. *Czech J. Anim. Sci.* 57(10): 490-497.

- Pamungkas, D., L. Affandhy, D.B. Wijono & Hartati. 2005. Aplikasi Inseminasi Semen Hasil Sexing pada Sapi Induk Peranakan Ongole. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2005*. 1-8.
- Partodiharjo, S. 1992. Ilmu Reproduksi Hewan. Jakarta. Mutiara Sumber Widya.
- Patrat, C., C. Serres & P. Jouannet. 2000. The Acrosome Reaction in Human Spermatozoa. *Biology of the Cell*. 92:255–266.
- Pillet, E., G. Duchamp, F. Batellier, V. Beaumal, M. Anton, S. Desherces, E. Schmitt & M. Magistrini. 2011. Egg Yolk Plasma Can Replace Egg Yolk in Stallion Freezing Extenders. *Theriogenology*. 75:105–114.
- Prasad, S., S. Rangasamy & S. Satheshkumar. 2010. Sex Preselection in Domestic Animals-Current Status and Future prospects. *Veterinary World*. 3(7):346-348.
- Pratiwi, W.C., D. Pamungkas, L. Affandhy & Hartati. 2006. Evaluasi Kualitas Spermatozoa Hasil Sexing pada Kemasan Straw Dingin yang Disimpan pada Suhu 5°C Selama 7 Hari. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2006*. 143-150.
- Rahmah, Z. 2007. Perubahan Integritas Membran Spermatozoa pada Proses Sexing dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. Program Pasca Sarjana Fakultas Matematika dan Ilmu Pengelahuan Alam Universitas Brawijaya. Malang. Tesis.
- Rathi, R., B. Colenbrander, M.M. Bevers & B.M. Gadella. 2001. Evaluation of In Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 65:462-470.
- Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, & Meyers SA. 2006. Equine Sperm Membrane Phase Behavior: The Effects of Lipid-Based Cryoprotectants. *Journal Biol Reprod*. 74:359–365.
- Rothe, N.H.I. 2003. Insemination of Cryopreserved Bull Semen Portions with Sperm Numbers After Dilution with Two Egg Yolk-Free Extenders. *Prossiding. European AI Vest Meeting Cattle Session; Budapest (Hungry)*:14-23.
- Safitri, D.H. 2011. Pengaruh Lama Waktu Sentrifugasi Semen Domba Ekor Gemuk terhadap Persentase Kapasitasi dan Reaksi Akrosom Spermatozoa. *Artikel Ilmiah*. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya:1-11.
- Saili, T., M.R. Toelihere, A. Boediono & B. Tappa. 2000. Keefektifan Albumen sebagai Media Pemisah Spermatozoa Sapi Pembawa Kromosom X dan Y. *Hayati*. 7(4):106-109.
- Salicioni, A.M., M.D. Platt, E.V. Wertheimer, E. Arcelay, A. Allaire, J. Sosnik dan P.E. Visconti. 2007. Signaling Pathways Involved in Sperm Capacitation. *cit*. Spermatology. E.RS Roldan dan M. Gomedio. Nottingham University Press. Nottingham:245-259.
- Sariozkan, S., P.B. Tuncer & M.N. Bucak. 2010. The Effects of Diluend Egg Yolk Consentration Used with Soy Bean Lechitin-Based-Extender on Semen Quality of Freeze Bull Semen. *Eurasian Journal of Veterinary Science*. 26(1):45-49.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisus: Yogyakarta. 26-38.

- Setiadi M.A., A. Suprayogi & Yulnawati. 2006. Viabilitas dan Integritas Membran Plasma Spermatozoa Epididymis Anjing Selama Penyimpanan pada Pengencer yang Berbeda. *Media Kedokteran Hewan*. 22(2):118-123.
- Sianturi, R.G., P. Situmorang, E. Triwulanningsih & D.A. Kusumaningrum. 2007. Pengaruh Penambahan Glutathione dan Kolesterol pada Pemisahan Spermatozoa X dan Y dengan Metode Kolom Albumin Telur. *Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. 207-213.
- Sianturi, R.G., P. Situmorang, E. Triwulanningsih, T. Sugiarti & D.A. Kusumaningrum. 2004. Pengaruh Isobutil Metilxantina (IMX) dan Waktu Pemisahan terhadap Kualitas dan Efektifitas Pemisahan Spermatozoa dengan Metode Kolom Albumin Telur. *JITV*. 9(4):246-251.
- Sikka, S.C. 2004. Role of Oxidative Stress & Antioxidant in Andrology and Assisted Reproductive Technology. *Journal of Andrology*. 25(5):5-17.
- Simmet, M.V.C. 2005. Bovine Artificial Insemination. Minitub Abfu-und Labortechnik. GmbH & Co KG. Germany.
- Sonjaya, H., Hasbi, Sutomo & Hastuti. 2005. Pengaruh Penambahan Calcium Ionophore terhadap Kualitas Spermatozoa Kambing Boer Hasil Seksing. *J. Sains & Teknologi*. 5(2):90-101.
- Sujoko, H., M.A. Setiadi & A. Boediono. 2009. Seleksi Spermatozoa Domba Garut dengan Metode Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll. *Jurnal Veteriner*. 10(3):125-132.
- Susilawati, T. 2001. Perubahan Kontrol Sistem Transport Ion Kalsium Spermatozoa Sapi Hasil Sentrifugasi Gradien Densitas Percoll pada Proses Seleksi Jenis Kelamin. *JIIP*. 11(2):1-9.
- Susilawati, T. 2002. Sexing Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Gradien Putih Telur. *Widya Agrika*. 10(2):97-105.
- Susilawati, T. 2003. Tingkat Keberhasilan Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur. *Jurnal Ilmiah dan Ilmu Peternakan dan Perikanan*. 20:1431-1438.
- Susilawati, T. 2005. Tingkat Keberhasilan Kebuntingan dan Ketepatan Jenis Kelamin Hasil Inseminasi Buatan Menggunakan Semen Beku Sexing pada Sapi Peranakan Ongole. *Animal Production*. 7(3):161-167.
- Susilawati, T. 2011. Spermatologi. Cetakan pertama. Penerbit UB Press. Malang.
- Susilawati, T., Hermanto, P. Srianto & E. Yuliani. 2002. Pemisahan Spermatozoa X dan Y pada Sapi Brahman Menggunakan Gradien Putih Telur pada Pengencer Tris dan Trus Kuning Telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Life Sciences)*. 14(2):176-181.
- Susilawati, T., P. Srianto, Hermanto & E. Yuliani. 2003. Inseminasi Buatan pada Sapi Peranakan Ongole Menggunakan Semen Beku Hasil Sexing dengan Gradien Konsentrasi Putih Telur. *Jurnal Ilmu-Ilmu Hayati (Life Science)*. 15(1):72-80.



- Susilowati, S. 2008. Kompleks Insulin Like Growth Factor-1 Mempengaruhi Presentase Membran Plasma Utuh dan Kadar Malondialdehid Spermatozoa. *Jurnal Veteriner*. 9(4):168-175.
- Tanphaicit, N., Y.S. Zeung, M. Kates, N. Abdullah, & A. Chan. 1996. Cholesterol and Phospholipid Levels of Washed and Percoll Gradient Centrifuged Mouse Sperm. *Journal Mol Reprod Dev*. 43:187-1612.
- Tolihere, M.R. 1985. Fisiologi Reproduksi pada Ternak. Cetakan ke-10. Penerbit Angkasa. Bandung.
- Udrayana, S.B. 2009. Proteksi Spermatozoa Kambing Peranakan Etawah Menggunakan Fosfatidil dalam Proses Sexing dengan Gradien BSA dan Pembekuan. Pogram Studi Doctor Ilmu Pertenakan Program Pascasarjana Fakultas Peternakan Universitas Diponegoro. Semarang. Disertasi.
- Uysal, O. & M.N. Bucak. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on The Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *ACTA VET. BRNO 2007*. 76:83-390.
- Verberckmoes S., A.Van Soom, J. Dewulf & A. de Kruif 2004. Comparison of Three Diluents for The Storage of Fresh Bovine Semen. *Theriogenology*: 42-63.
- Visconti, P.E., H. Galantino-Homer, G.D. Moore, J.L. Bailey, X. Ning, M. Fornes & G.S. Kopf. 1998. The Molecular Basis of Sperm Capacitation. *Journal of Andrology*. 12(2):242-246.
- White, I.G. 1993. Lipid and Calcium Uptake of Sperm in Relation ti Cold Shock and Preservation: A Review. *Reproduction and Fertility Development*. 5:639-658.
- Yamashiro, H., H. Wang, Y. Yamashita, K. Kumamoto & T. Terada. 2006. Enhanced Freezability of Goat Spermatozoa Collected into Tubes Containing Extender Supplemented with Bovine Serum Albumin (BSA). *Journal of Reproduction and Development*. 52(3):407-414.

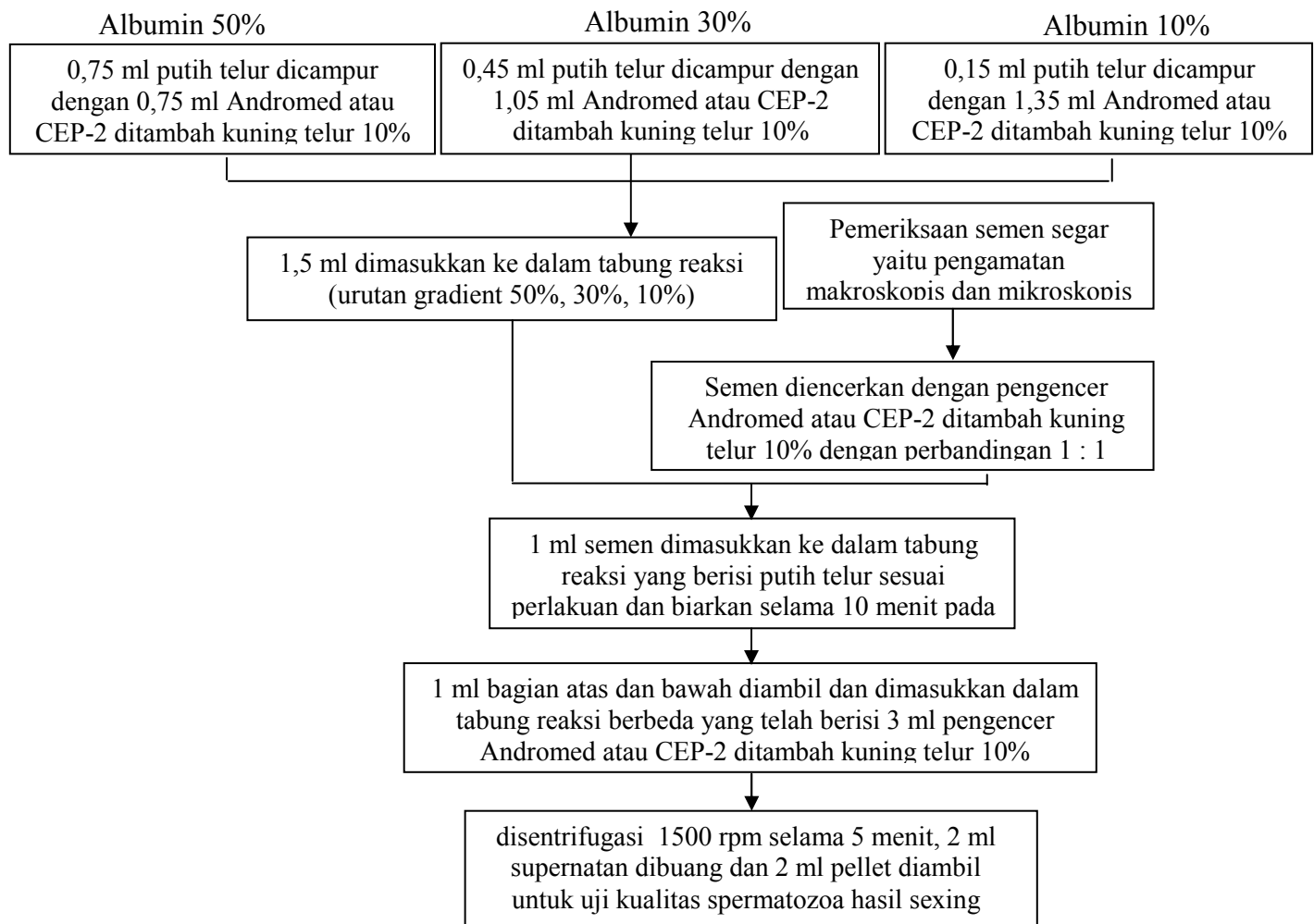
## Lampiran 1 Persiapan Reagen dan Cara Membuat Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%

Tabel 1. Komposisi penyusun pengencer CEP-2

Bahan	Unit
NaCl	15 mmol/l
KCl	7 mmol/l
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	3 mmol/l
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	4 mmol/l
NaHCO <sub>3</sub>	11,9 mmol/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8 mmol/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 mmol/l
Fruktosa	55 mmol/l
Sorbitol	1 g/l
BSA	2 g/l
Tris	133,7 mmol/l
Gentamicin	0,05 g/l
Asam sitrat	42,9 mmol/l
pH 6,6	

Proses pembuatan dilakukan dengan cara mencampur bahan-bahan yang terdapat pada tabel 1 dengan *diionize water* (DI) menggunakan *magnetic stirrer*, kecuali BSA ditambahkan ketika CEP-2 akan digunakan. Kemudian dilakukan *adjust* pH agar CEP-2 memiliki pH 6,6. Pada pengencer CEP-2 kemudian ditambahkan kuning telur 10% dengan cara memasukkan 10 ml kuning telur ke dalam 90 ml CEP-2, pencampuran dilakukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 30 menit. Pengencer CEP-2 yang telah ditambah kuning telur kemudian disentrifugasi pada kecepatan 1500 rpm selama 30 menit, *supernatant* dipindahkan dalam tabung reaksi baru sedangkan *pellet* dibuang. Sentrifugasi ini dilakukan sebanyak 4 kali, yaitu 2 kali pada hari pertama dan 2 kali pada hari kedua. Penambahan BSA sebanyak 2 g/l dilakukan dengan cara diaduk menggunakan pengaduk kaca.

## Lampiran 2 Prosedur pemisahan spermatozoa X dan Y menggunakan albumin putih telur



### Lampiran 3. Persiapan Reagen untuk Mengamati Kapasitas Spermatozoa Menggunakan Pewarna CTC

#### Langkah 1 : Pembuatan Larutan DABCO

1. 250 mg DABCO (D-2522) dilarutkan dalam 9 ml gliserol (ditempatkan dalam tabung yang dibungkus *aluminium foil* agar terlindung dari sinar).
2. Diletakkan pada *waterbath* dengan temperatur 37°C selama 3-4 jam dan dikocok dari waktu ke waktu.
3. Tambah 1 ml PBS Dulbecco's kedalam larutan dan dicampur hingga merata.
4. Larutan dibagi dalam tiga tabung tertutup yang dibungkus dengan *aluminium foil* dan disimpan didalam *freezer*.

#### Langkah 2 : Pembuatan CTC Buffer 20mM NaCl

1. 0,2422 g Tris (*Trizma base*, Sigma T-1503) dan 0,7592 g NaCl dilarutkan kedalam 100 ml *Diionized water*.
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam refrigerator.

#### Langkah 3 : Fixative Buffer : 1 M Tris (*Trizma base* produksi Sigma T-1503)

1. 6,057 g Tris dilarutkan dalam 50 ml *Diionized Water*.
2. Kemudian dicampur, disaring dan disimpan dalam refrigerator.

#### Langkah 4 : Paraformaldehyde 25% (Sigma P-6148).

1. 12,5 g *paraformaldehyde* dilarutkan dalam 50 ml *Diionized Water* (dalam ruang asam atau lemari uap).
2. Larutan dipanaskan sambil *distirer* sampai berwarna putih susu (5 sampai 10 menit) dan ditambahkan 1 M NaOH sampai larutan menjadi terang.

#### Langkah 5 : CTC Fixative 12.5% Paraformaldehyde dalam 0,5 Tris

1. Larutan *paraformaldehyde* (langkah 4) dicampur dengan larutan *buffer* 1 M Tris (langkah 3) 1: 1.
2. pH diatur sampai 7,4 dengan 0,2 M HCl secara hati-hati dan selanjutnya disimpan dalam *refrigerator*.

#### Langkah 6 : Larutan Pewarna CTC

1. 0,0044 g *CTC powder* (Sigma C-7880) dimasukkan ke dalam tabung yang dibungkus dengan *aluminium foil* ditambahkan 0,0044 g *L-Systein (Hydrochloride Monohydrate)* dan ditambahkan 5 ml *CTC Buffer* (Langkah2).
2. pH diatur sampai 7,8 dengan 0,2 M HCl secara hati-hati.

#### Lampiran 4. Uji T Berpasangan Persentase Motilitas Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)

Tabel 4. Persentase Motilitas Individu Spermatozoa Sesudah Sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
1	60	55	55	55
2	65	55	50	50
3	65	60	55	50
4	65	50	50	50
5	65	55	60	50
6	65	50	65	50
7	60	50	60	50
8	60	50	55	65
9	65	55	60	65
10	60	55	60	65
Rata-rata	63	53.5	57	55
SD	2,58	3,37	4,83	7,07

Data menyebar antara 50%-65% sehingga tidak perlu dilakukan transformasi (Sastrosupadi, 2000).

##### A. Uji T Berpasangan Persentase Motilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Atas

Ulangan	Motilitas spermatozoa		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	60	55	5	25
2	65	50	15	225
3	65	55	10	100
4	65	50	15	225
5	65	60	5	25
6	65	65	0	0
7	60	60	0	0
8	60	55	5	25
9	65	60	5	25
10	60	60	0	0
Σ	630	570	60	650
$\bar{X}$	63	57	6	65

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 650 - \frac{(60)^2}{10} = 650 - 360 = 290$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{290}{10(10-1)}} = 1,795$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{6}{1,795} = 3,343$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} > t_{0,05 (9)}$  yaitu  $3,343 > 2,262$  maka hipotesis  $H_1$  diterima:  
sehingga, persentase motilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer Andromed tidak sama atau berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

**B. Uji T Berpasangan Persentase Motilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Bawah**

Ulangan	Motilitas lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	55	55	0	0
2	55	50	5	25
3	60	50	10	100
4	50	50	0	0
5	55	50	5	25
6	50	50	0	0
7	50	50	0	0
8	50	65	-15	225
9	55	65	-10	100
10	55	65	-10	100
$\Sigma$	535	550	-15	575
$\bar{X}$	53,5	55,0	-2	58

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 575 - \frac{(-15)^2}{10} = 575 - 22,5 = 552,50$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{552,50}{10(10-1)}} = 2,478$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-2}{2,478} = -0,605$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,605 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase motilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

C. Uji T Berpasangan Persentase Motilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Motilitas Andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	60	55	5	25
2	65	55	10	100
3	65	60	5	25
4	65	50	15	225
5	65	55	10	100
6	65	50	15	225
7	60	50	10	100
8	60	50	10	100
9	65	55	10	100
10	60	55	5	25
Σ	630	535	95	1025
$\bar{X}$	63,0	53,5	10	103

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 1025 - \frac{(95)^2}{10} = 1025 - 902,5 = 122,5$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{122,5}{10(10-1)}} = 1,167$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{103}{1,167} = 8,143$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} > t_{0,05 (9)}$  yaitu  $8,143 > 2,262$  maka hipotesis H1 diterima:

sehingga, persentase motilitas spermatozoa hasil sexing yang menggunakan Andromed pada lapisan atas tidak sama atau berbeda dengan lapisan bawah.

D. Uji T Berpasangan Persentase Motilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Motilitas CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	55	55	0	0
2	50	50	0	0
3	55	50	5	25
4	50	50	0	0
5	60	50	10	100
6	65	50	15	225
7	60	50	10	100
8	55	65	-10	100
9	60	65	-5	25
10	60	65	-5	25
Σ	570	550	20	600
$\bar{X}$	57,0	55,0	2	60

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 600 - \frac{(20)^2}{10} = 600 - 40 = 560$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{560}{10(10-1)}} = 2,494$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{2}{2,494} = 0,802$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,802 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase motilitas spermatozoa hasil sexing yang menggunakan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah



**Lampiran 5. Uji T Berpasangan Persentase Viabilitas Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 5. Persentase viabilitas spermatozoa sesudah sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
1	91,75	93,66	90,05	94,74
2	90,74	91,24	95,56	92,16
3	92,89	93,59	95,18	92,82
4	91,16	89,55	96,15	89,20
5	92,02	93,30	84,49	94,79
6	97,06	94,58	97,55	90,45
7	93,75	93,33	95,69	94,44
8	95,00	90,40	94,04	95,07
9	82,29	89,95	89,50	93,91
10	92,42	91,71	94,79	91,40
Rata-rata	91,91	92,13	93,30	92,90
SD	3,88	1,78	4,03	2,04

Data menyebar antara 82, %-97,06% sehingga perlu dilakukan transformasi akar kuadrat (Sastrosupadi, 2000).

Hasil Transformasi Akar Kuadrat Persentase Viabilitas Spermatozoa

Ulangan	Andromed		CEP-2	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. Bawah
1	9,605	9,704	9,516	9,759
2	9,552	9,578	9,801	9,626
3	9,664	9,700	9,781	9,660
4	9,574	9,490	9,831	9,471
5	9,618	9,685	9,219	9,762
6	9,877	9,751	9,902	9,537
7	9,708	9,687	9,808	9,744
8	9,772	9,534	9,723	9,776
9	9,099	9,511	9,487	9,716
10	9,640	9,602	9,761	9,586
Jumlah	96,110	96,242	96,829	96,638
Rata-rata	9,611	9,624	9,683	9,664

A. Uji T Berpasangan Persentase Viabilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Atas

Ulangan	Viabilitas lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	9,600	9,520	0,080	0,006
2	9,550	9,800	-0,250	0,063
3	9,660	9,780	-0,120	0,014
4	9,570	9,830	-0,260	0,068
5	9,620	9,220	0,400	0,160
6	9,880	9,900	-0,020	0,000
7	9,710	9,810	-0,100	0,010
8	9,770	9,720	0,050	0,002
9	9,100	9,490	-0,390	0,152
10	9,640	9,760	-0,120	0,014
Σ	96,100	96,830	-0,730	0,490
$\bar{X}$	9,610	9,683	-0,073	0,049

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,490 - \frac{(-0,730)^2}{10} = 0,490 - 0,053 = 0,437$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,437}{10(10-1)}} = 0,070$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,073}{0,070} = -1,048$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $1,048 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase viabilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Persentase Viabilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Viabilitas lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	9,704	9,759	-0,055	0,003
2	9,578	9,626	-0,048	0,002
3	9,700	9,660	0,040	0,002
4	9,490	9,471	0,018	0,000
5	9,685	9,762	-0,077	0,006
6	9,751	9,537	0,214	0,046
7	9,687	9,744	-0,057	0,003
8	9,534	9,776	-0,242	0,058
9	9,511	9,716	-0,206	0,042
10	9,602	9,586	0,016	0,000
Σ	96,242	96,638	-0,396	0,163
$\bar{X}$	9,624	9,664	-0,040	0,016

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,163 - \frac{(-0,396)^2}{10} = 0,163 - 0,016 = 0,147$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,147}{10(10-1)}} = 0,040$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,040}{0,040} = -0,979$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,979 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase viabilitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

C. Uji T Berpasangan Persentase Viabilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Viabilitas andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	9,605	9,704	-0,099	0,0098
2	9,552	9,578	-0,026	0,0007
3	9,664	9,700	-0,036	0,0013
4	9,574	9,490	0,084	0,0071
5	9,618	9,685	-0,067	0,0044
6	9,877	9,751	0,126	0,0159
7	9,708	9,687	0,021	0,0005
8	9,772	9,534	0,238	0,0567
9	9,099	9,511	-0,412	0,1693
10	9,640	9,602	0,037	0,0014
Σ	96,110	96,242	-0,132	0,2671
$\bar{X}$	9,611	9,624	-0,013	0,027

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,267 - \frac{(-0,132)^2}{10} = 0,267 - 0,0017 = 0,265$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,265}{10(10-1)}} = 0,054$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{S_D} = \frac{-0,013}{0,054} = -0,239$$

$$t_{0,05(9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05(9)}$  yaitu  $0,239 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase viabilitas spermatozoa hasil sexing yang menggunakan Andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah.

D. Uji T Berpasangan Persentase Viabilitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Viabilitas CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	9,516	9,759	-0,243	0,059
2	9,801	9,626	0,175	0,031
3	9,781	9,660	0,121	0,015
4	9,831	9,471	0,360	0,130
5	9,219	9,762	-0,543	0,294
6	9,902	9,537	0,365	0,133
7	9,808	9,744	0,064	0,004
8	9,723	9,776	-0,053	0,003
9	9,487	9,716	-0,230	0,053
10	9,761	9,586	0,175	0,031
Σ	96,829	96,638	0,192	0,752
$\bar{X}$	9,683	9,664	0,019	0,075

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 0,752 - \frac{(0,192)^2}{10} = 0,752 - 0,0037 = 0,75$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,748}{10(10-1)}} = 0,091$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,019}{0,091} = 0,210$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,208 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase viabilitas spermatozoa hasil sexing yang menggunakan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

**Lampiran 6. Uji T Berpasangan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 6. Persentase abnormalitas spermatozoa sesudah sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
1	10,78	7,66	5,94	16,98
2	5,80	9,09	2,22	13,70
3	9,52	10,86	1,75	4,55
4	10,53	15,46	6,19	8,42
5	5,34	7,91	9,09	2,43
6	3,43	2,94	6,97	10,05
7	3,38	7,00	5,94	7,96
8	6,70	9,17	15,23	8,26
9	13,85	5,45	7,04	9,66
10	12,31	3,85	7,87	5,61
Rata-rata	8,16	7,94	6,82	8,76
SD	3,72	3,60	3,74	4,26

Data menyebar antara 1,75%-16,98% sehingga perlu dilakukan transformasi akar kuadrat (Sastrosupadi, 2000).

Hasil Transformasi Akar Kuadrat Persentase Abnormalitas Spermatozoa

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. Bawah
1	3,36	2,86	2,54	4,18
2	2,51	3,10	1,65	3,77
3	3,17	3,37	1,50	2,25
4	3,32	4,00	2,59	2,99
5	2,42	2,90	3,10	1,71
6	1,98	1,86	2,73	3,25
7	1,97	2,74	2,54	2,91
8	2,68	3,11	3,97	2,96
9	3,79	2,44	2,75	3,19
10	3,58	2,08	2,89	2,47
Jumlah	28,77	28,44	26,25	29,67
Rata-rata	2,88	2,84	2,62	2,97

A. Uji T Berpasangan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada Lapisan Atas

Ulangan	Abnormalitas lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	3,359	2,538	0,821	0,675
2	2,509	1,650	0,859	0,739
3	3,166	1,501	1,665	2,771
4	3,321	2,587	0,734	0,539
5	2,417	3,097	-0,680	0,462
6	1,983	2,732	-0,749	0,561
7	1,969	2,538	-0,569	0,324
8	2,683	3,966	-1,282	1,645
9	3,788	2,746	1,041	1,084
10	3,579	2,893	0,686	0,470
Σ	28,774	26,248	2,526	9,269
$\bar{X}$	2,877	2,625	0,253	0,927

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 9,270 - \frac{(2,526)^2}{10} = 9,270 - 0,638 = 8,632$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{8,632}{10(10-1)}} = 0,310$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,253}{0,310} = 0,816$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,817 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase abnormalitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan menggunakan pengencer CEP-2 Pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Abnormalitas lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	2,856	4,181	-1,325	1,756
2	3,097	3,768	-0,671	0,450
3	3,370	2,246	1,124	1,263
4	3,995	2,986	1,010	1,019
5	2,899	1,711	1,189	1,413
6	1,855	3,248	-1,393	1,941
7	2,739	2,909	-0,171	0,029
8	3,110	2,959	0,151	0,023
9	2,438	3,188	-0,749	0,562
10	2,085	2,472	-0,388	0,150
Σ	28,445	29,669	-1,224	8,606
$\bar{X}$	2,844	2,967	-0,122	0,861

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 8,606 - \frac{(-2,224)^2}{10} = 8,606 - 0,491 = 8,115$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{8,115}{10(10-1)}} = 0,301$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{S_D} = \frac{-0,122}{0,301} = -0,405$$

$$t_{0,05(9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05(9)}$  yaitu  $0,405 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase abnormalitas spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan CEP-2 ditambah kuning telur 10%.



C. Uji T Berpasangan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Abnormalitas andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	3,359	2,856	0,503	0,253
2	2,509	3,097	-0,588	0,345
3	3,166	3,370	-0,204	0,042
4	3,321	3,995	-0,675	0,455
5	2,417	2,899	-0,482	0,232
6	1,983	1,855	0,128	0,016
7	1,969	2,739	-0,770	0,593
8	2,683	3,110	-0,427	0,182
9	3,788	2,438	1,349	1,821
10	3,579	2,085	1,494	2,232
Σ	28,774	28,445	0,330	6,172
$\bar{X}$	2,877	2,844	0,033	0,617

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 6,172 - \frac{(0,330)^2}{10} = 6,172 - 0,011 = 6,161$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{6,161}{10(10-1)}} = 0,262$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,033}{0,262} = 0,126$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,126 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase abnormalitas spermatozoa hasil sexing yang menggunakan Andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah.

D. Uji T Berpasangan Persentase Abnormalitas Spermatozoa Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Abnormalitas CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	2,538	4,181	-1,643	2,700
2	1,650	3,768	-2,118	4,487
3	1,501	2,246	-0,745	0,555
4	2,587	2,986	-0,399	0,159
5	3,097	1,711	1,386	1,921
6	2,732	3,248	-0,516	0,266
7	2,538	2,909	-0,372	0,138
8	3,966	2,959	1,007	1,013
9	2,746	3,188	-0,441	0,195
10	2,893	2,472	0,421	0,177
Σ	26,248	29,669	-3,421	11,612
$\bar{X}$	2,625	2,967	-0,342	1,161

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 11,612 - \frac{(-3,421)^2}{10} = 11,612 - 1,170 = 10,442$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{10,442}{10(10-1)}} = 0,341$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,342}{0,341} = -1,004$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $1,004 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase abnormalitas spermatozoa hasil sexing yang menggunakan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

**Lampiran 7. Uji T Berpasangan Konsentrasi Spermatozoa Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 7. Konsentrasi spermatozoa sesudah sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Bawah (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Atas (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Bawah (10 <sup>6</sup> /ml)
1	550	540	790	730
2	380	630	530	240
3	580	460	880	670
4	860	560	960	530
5	930	630	830	470
6	830	550	860	620
7	740	360	1040	530
8	570	930	420	600
9	480	400	710	480
10	340	620	300	400
Rata-rata	626	568	732	527
SD	204.52	158.38	241.15	141.27

**A. Uji T Berpasangan Konsentrasi Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas**

Ulangan	Konsentrasi spermatozoa lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	550	790	-240	57600
2	380	530	-150	22500
3	580	880	-300	90000
4	860	960	-100	10000
5	930	830	100	10000
6	830	860	-30	900
7	740	1040	-300	90000
8	570	420	150	22500
9	480	710	-230	52900
10	340	300	40	1600
Σ	6260	7320	-1060	358000
$\bar{X}$	626	732	-106	35800

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 358000 - \frac{(-1060)^2}{10} = 358000 - 112360 = 245640$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{245640}{10(10-1)}} = 52,243$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-106}{52,243} = -2,029$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $2,029 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, konsentrasi spermatozoa hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Konsentrasi Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 pada Lapisan Bawah

Ulangan	Konsentrasi spermatozoa lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	540	730	-190	36100
2	630	240	390	152100
3	460	670	-210	44100
4	560	530	30	900
5	630	470	160	25600
6	550	620	-70	4900
7	360	530	-170	28900
8	930	600	330	108900
9	400	480	-80	6400
10	620	400	220	48400
$\Sigma$	5680	5270	410	456300
$\bar{X}$	568	527	41	45630

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 456300 - \frac{(410)^2}{10} = 456300 - 16810 = 439490$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{439490}{10(10-1)}} = 69,88$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{41}{69,88} = 0,587$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,587 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, konsentrasi spermatozoa hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan CEP-2.

C. Uji T Berpasangan Konsentrasi Spermatozoa Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Konsentrasi spermatozoa andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	550	540	10	100
2	380	630	-250	62500
3	580	460	120	14400
4	860	560	300	90000
5	930	630	300	90000
6	830	550	280	78400
7	740	360	380	144400
8	570	930	-360	129600
9	480	400	80	6400
10	340	620	-280	78400
Σ	6260	5680	580	694200
$\bar{X}$	626	568	58	69420

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 694200 - \frac{(580)^2}{10} = 694200 - 33640 = 660560$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{660560}{10(10-1)}} = 85,671$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{58}{85,671} = 0,677$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,677 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, konsentrasi spermatozoa hasil sexing yang menggunakan Andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

D. Uji T Berpasangan Konsentrasi Spermatozoa Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Konsentrasi spermatozoa CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
1	790	730	60	3600
2	530	240	290	84100
3	880	670	210	44100
4	960	530	430	184900
5	830	470	360	129600
6	860	620	240	57600
7	1040	530	510	260100
8	420	600	-180	32400
9	710	480	230	52900
10	300	400	-100	10000
Σ	7320	5270	2050	859300
$\bar{X}$	732	527	205	85930

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 859300 - \frac{(2050)^2}{10} = 859300 - 420250 = 439050$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{439050}{10(10-1)}} = 69,845$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{205}{69,845} = 2,935$$

$$t_{0,05(9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} > t_{0,05(9)}$  yaitu  $2,935 > 2,262$  maka hipotesis  $H_1$  diterima:

sehingga, konsentrasi spermatozoa hasil sexing yang menggunakan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas tidak sama atau berbeda dengan lapisan bawah

**Lampiran 8. Uji T Berpasangan Total Spermatozoa Motil Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 8. total spermatozoa motil sesudah sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Bawah (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Atas (10 <sup>6</sup> /ml)	Lap. Bawah (10 <sup>6</sup> /ml)
1	165,00	148,50	217,25	200,75
2	123,50	173,25	132,50	60,00
3	188,50	138,00	242,00	167,50
4	279,50	140,00	240,00	132,50
5	302,25	173,25	249,00	117,50
6	269,75	137,50	279,50	155,00
7	222,00	90,00	312,00	132,50
8	171,00	232,50	115,50	195,00
9	156,00	110,00	213,00	156,00
10	102,00	170,50	90,00	130,00
Rata-rata	197,95	151,35	209,08	144,68
SD	68,05	39,29	73,08	40,62

A. Uji T Berpasangan Total Spermatozoa Motil Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas

Ulangan	Tot. Spz. Motil Lap. Atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	165,00	217,25	-52,25	2730,06
2	123,50	132,50	-9,00	81,00
3	188,50	242,00	-53,50	2862,25
4	279,50	240,00	39,50	1560,25
5	302,25	249,00	53,25	2835,56
6	269,75	279,50	-9,75	95,06
7	222,00	312,00	-90,00	8100,00
8	171,00	115,50	55,50	3080,25
9	156,00	213,00	-57,00	3249,00
10	102,00	90,00	12,00	144,00
Σ	1979,50	2090,75	-111,25	24737,44
$\bar{X}$	68,05	73,08	-11,13	2473,74

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 24737,44 - \frac{(-111,25)^2}{10} = 24737,44 - 1237,66 = 23499,78$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{23499,78}{10(10-1)}} = 16,16$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-11,13}{16,16} = -0,688$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,688 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, total spermatozoa motil hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Total Spermatozoa Motil Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Tot. Spz. Motil Lap. Bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
1	148,50	200,75	-52,25	2730,06
2	173,25	60,00	113,25	12825,56
3	138,00	167,50	-29,50	870,25
4	140,00	132,50	7,50	56,25
5	173,25	117,50	55,75	3108,06
6	137,50	155,00	-17,50	306,25
7	90,00	132,50	-42,50	1806,25
8	232,50	195,00	37,50	1406,25
9	110,00	156,00	-46,00	2116,00
10	170,50	130,00	40,50	1640,25
$\Sigma$	1513,50	1446,75	66,75	26865,19
$\bar{X}$	39,29	40,62	6,68	2686,52

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 26865,19 - \frac{(66,75)^2}{10} = 26865,19 - 445,56 = 26419,63$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{26419,63}{10(10-1)}} = 17,13$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata d}}{SD} = \frac{6,68}{17,13} = 0,390$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $0,390 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, total spermatozoa motil hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%.



C. Uji T Berpasangan Total Spermatozoa Motil Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah

Ulangan	Tot. Spz. Motil Andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap atas (A)	Lap bawah (B)		
1	165,00	148,50	16,50	272,25
2	123,50	173,25	-49,75	2475,06
3	188,50	138,00	50,50	2550,25
4	279,50	140,00	139,50	19460,25
5	302,25	173,25	129,00	16641,00
6	269,75	137,50	132,25	17490,06
7	222,00	90,00	132,00	17424,00
8	171,00	232,50	-61,50	3782,25
9	156,00	110,00	46,00	2116,00
10	102,00	170,50	-68,50	4692,25
Σ	1979,50	1513,50	466,00	86903,38
$\bar{X}$	68,05	39,29	46,60	8690,34

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 86903,38 - \frac{(466)^2}{10} = 86903,38 - 21715,6 = 65187,78$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{65187,78}{10(10-1)}} = 26,913$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{46,6}{26,913} = 1,732$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (9)}$  yaitu  $1,732 < 2,262$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, total spermatozoa motil hasil sexing menggunakan pengencer andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah.

D. Uji T Berpasangan Total Spermatozoa Motil Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah

Ulangan	Tot. Spz. Motil CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap atas (A)	Lap bawah (B)		
1	217,25	200,75	16,50	272,25
2	132,50	60,00	72,50	5256,25
3	242,00	167,50	74,50	5550,25
4	240,00	132,50	107,50	11556,25
5	249,00	117,50	131,50	17292,25
6	279,50	155,00	124,50	15500,25
7	312,00	132,50	179,50	32220,25
8	115,50	195,00	-79,50	6320,25
9	213,00	156,00	57,00	3249,00
10	90,00	130,00	-40,00	1600,00
Σ	2090,75	1446,75	644,00	98817,00
$\bar{X}$	209,08	144,68	64,40	9881,70

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 98817 - \frac{(644)^2}{10} = 98817 - 41473,6 = 57343,4$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{57343,4}{10(10-1)}} = 25,242$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{64,4}{25,242} = 2,551$$

$$t_{0,05 (9)} = 2,262$$

$t_{\text{hitung}} > t_{0,05 (9)}$  yaitu  $2,551 > 2,262$  maka hipotesis  $H_1$  diterima:

sehingga, total spermatozoa motil hasil sexing menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas tidak sama atau berbeda dengan lapisan bawah.

**Lampiran 9. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Memiliki Integritas Membran Baik Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 9. Persentase spermatozoa yang memiliki integritas membran baik

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
8	83,72	74,51	84,89	84,30
9	77,86	91,67	87,81	89,19
10	88,89	84,68	78,13	77,78
Rata-rata	83,49	83,62	83,61	83,76
SD	5,52	8,63	4,97	5,73

Data menyebar antara 74,51%-91,86% sehingga perlu dilakukan transformasi akar kuadrat (Sastrosupadi, 2000).

Hasil transformasi akar kuadrat persentase spermatozoa dengan integritas membran baik

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. Bawah
8	9,18	8,66	9,24	9,21
9	8,85	9,60	9,40	9,47
10	9,45	9,23	8,87	8,85
Jumlah	27,48	27,49	27,51	27,53
Rata-rata	9,16	9,16	9,17	9,18

**A. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Menggunakan Pengencer Andromed dan pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas**

Ulangan	Integritas membran lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	9,177	9,241	-0,063	0,004
9	8,852	9,398	-0,545	0,297
10	9,455	8,867	0,587	0,345
Σ	27,484	27,505	-0,021	0,646
$\bar{X}$	9,161	9,168	-0,007	0,215

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,646 - \frac{(0,021)^2}{3} = 0,646 - 1E-04 = 6E-01$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{6E-01}{3(3-1)}} = 0,328$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,007}{0,328} = -0,022$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (2)}$  yaitu  $0,021 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa dengan integritas membran baik hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%,

B. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Menggunakan Pengencer Andromed dan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Integritas membran lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	8,661	9,209	-0,548	0,300
9	9,600	9,470	0,130	0,017
10	9,230	8,847	0,382	0,146
Σ	27,491	27,527	-0,036	0,463
$\bar{X}$	9,164	9,176	-0,012	0,154

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,463 - \frac{(0,036)^2}{3} = 0,463 - 0,000432 = 0,462$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,462}{3(3-1)}} = 0,278$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,012}{0,278} = -0,04$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (3)}$  yaitu  $0,043 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa dengan integritas membran baik hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

C. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Integritas membran andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	9,177	8,661	0,516	0,267
9	8,852	9,600	-0,748	0,560
10	9,455	9,230	0,225	0,051
Σ	27,484	27,491	-0,007	0,877
$\bar{X}$	9,161	9,164	-0,002	0,292

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,877 - \frac{(0,007)^2}{3} = 0,877 - 1,63333E-05 = 0,877$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,877}{3(3-1)}} = 0,382$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,002}{0,382} = -0,006$$

$$t_{0,05 (3)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05(2)}$  yaitu  $0,006 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:  
 sehingga, persentase spermatozoa dengan integritas membran baik hasil sexing yang menggunakan Andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

D. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa dengan Integritas Membran Baik Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Integritas membran CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	9,241	9,209	0,032	0,001
9	9,398	9,470	-0,073	0,005
10	8,867	8,847	0,020	0,0004
$\Sigma$	27,505	27,527	-0,022	0,007
$\bar{X}$	9,168	9,176	-0,007	0,002

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 0,007 - \frac{(-0,022)^2}{3} = 0,007 - 0,00016 = 0,0068$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,0068}{3(3-1)}} = 0,034$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,007}{0,034} = -0,205$$

$$t_{0,05(2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05(2)}$  yaitu  $0,207 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:  
 sehingga, persentase spermatozoa dengan integritas membran baik hasil sexing yang menggunakan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

**Lampiran 10. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 10. Persentase Spermatozoa yang Belum Kapasitasi Sesudah Sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
8	82,31	87,18	78,38	81,97
9	83,02	87,31	87,29	89,63
10	85,40	87,36	85,16	90,54
Rata-rata	83,58	87,28	83,61	87,38
SD	1,62	0,09	4,65	4,71

Data menyebar antara 78,38%-90,54% sehingga perlu dilakukan transformasi akar kuadrat (Sastrosupadi, 2000).

Hasil Transformasi Akar Kuadrat Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. Bawah
8	9,10	9,36	8,88	9,08
9	9,14	9,37	9,37	9,49
10	9,27	9,37	9,26	9,54
Jumlah	27,51	28,11	27,51	28,12
Rata-rata	9,17	9,37	9,17	9,37

**A. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas**

Ulangan	Spermatozoa belum kapasitasi lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	9,100	8,881	0,219	0,048
9	9,139	9,370	-0,231	0,053
10	9,268	9,255	0,013	0,000
Σ	27,507	27,506	0,001	0,101
$\bar{X}$	9,169	9,169	0,0005	0,034

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,101 - \frac{(0,001)^2}{3} = 0,101 - 3,333E-07 = 0,1012$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,1012}{3(3-1)}} = 0,130$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{S_D} = \frac{0,0005}{0,130} = 0,003$$

$$t_{0,05(2)} = 4,303$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05(2)}$  yaitu  $0,003 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa belum kapasitasasi hasil sexing pada lapisan atas yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan menggunakan pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa belum Kapasitasasi Menggunakan Pengencer Andromed dan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Spermatozoa belum kapasitasasi lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	9,364	9,081	0,283	0,080
9	9,371	9,494	-0,123	0,015
10	9,373	9,542	-0,168	0,028
Σ	28,108	28,116	-0,009	0,123
$\bar{X}$	9,369	9,372	-0,003	0,041

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,123 - \frac{(-0,009)^2}{3} = 0,123 - 0,000027 = 0,1229$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,1229}{3(3-1)}} = 0,143$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,003}{0,143} = -0,021$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (3)}$  yaitu  $0,021 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa belum kapasitasasi hasil sexing pada lapisan bawah yang menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%.

C. Uji T Berpasangan Spermatozoa Belum Kapasitasasi Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Spermatozoa belum kapasitasasi andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	9,100	9,364	-0,264	0,069
9	9,139	9,371	-0,232	0,054
10	9,268	9,373	-0,105	0,011
Σ	27,507	28,108	-0,600	0,134
$\bar{X}$	9,169	9,369	-0,200	0,045

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,134 - \frac{(-0,600)^2}{3} = 0,134 - 0,12 = 0,014$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,014}{3(3-1)}} = 0,048$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,200}{0,048} = -4,126$$

$$t_{0,05(2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05(2)}$  yaitu  $4,140 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa belum kapasitasasi hasil sexing yang menggunakan Andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

D. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasasi Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Spermatozoa belum kapasitasasi CEP-2 ditambah kuning telur 10%		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	8,881	9,081	-0,200	0,040
9	9,370	9,494	-0,124	0,015
10	9,255	9,542	-0,286	0,082
$\Sigma$	27,506	28,116	-0,610	0,137
$\bar{X}$	9,169	9,372	-0,203	0,046

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 0,137 - \frac{(-0,610)^2}{3} = 0,137 - 0,124 = 0,013$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,013}{3(3-1)}} = 0,046$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{S_D} = \frac{-0,203}{0,046} = -4,413$$

$$t_{0,05(2)} = 4,303$$

$t_{hitung} > t_{0,05(2)}$  yaitu  $4,413 > 4,303$  maka hipotesis  $H_1$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa belum kapasitasasi hasil sexing yang menggunakan CEP-2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas tidak sama atau berbeda dengan lapisan bawah



**Lampiran 11. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Kapasitas Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 11. Persentase spermatozoa yang kapasitasi sesudah sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
8	10,88	8,72	14,19	10,66
9	11,95	4,48	7,63	6,67
10	10,22	8,62	10,94	6,76
Rata-rata	11,02	7,27	10,92	8,03
SD	0,87	2,42	3,28	2,28

Data menyebar antara 4,48%-14,19% sehingga perlu dilakukan transformasi akar kuadrat (Sastrosupadi, 2000).

Hasil Transformasi Akar Kuadrat Persentase Spermatozoa yang Kapasitasi

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. Bawah
8	3,37	3,04	3,83	3,34
9	3,53	2,23	2,85	2,68
10	3,27	3,02	3,38	2,69
Jumlah	10,18	8,29	10,07	8,71
Rata-rata	3,39	2,76	3,36	2,90

**A. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Kapasitasi Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas**

Ulangan	Spermatozoa yang kapasitasi lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	3,374	3,833	-0,459	0,210
9	3,528	2,851	0,678	0,459
10	3,274	3,382	-0,108	0,012
Σ	10,176	10,065	0,111	0,681
$\bar{X}$	3,392	3,355	0,037	0,227

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,681 - \frac{(0,111)^2}{3} = 0,681 - 0,004 = 0,677$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,677}{3(3-1)}} = 0,336$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,037}{0,336} = 0,110$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (2)}$  yaitu  $0,110 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa yang kapasitasasi hasil sexing pada lapisan atas dengan menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Kapasitas Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Spermatozoa yang kapasitasasi lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	3,036	3,340	-0,304	0,092
9	2,231	2,677	-0,446	0,199
10	3,020	2,694	0,326	0,106
Σ	8,287	8,711	-0,424	0,398
$\bar{X}$	2,762	2,904	-0,141	0,133

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,398 - \frac{(-0,424)^2}{3} = 0,398 - 0,059 = 0,338$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,338}{3(3-1)}} = 0,237$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{-0,141}{0,237} = -0,594$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (3)}$  yaitu  $0,594 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa yang kapasitasasi hasil sexing pada lapisan bawah dengan menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

C. Uji T Berpasangan Spermatozoa yang Kapasitas Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Spermatozoa yang kapasitasasi Andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	3,374	3,036	0,338	0,114
9	3,528	2,231	1,297	1,683
10	3,274	3,020	0,254	0,064
Σ	10,176	8,287	1,889	1,862
$\bar{X}$	3,392	2,762	0,630	0,621

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 1,862 - \frac{(1,889)^2}{3} = 1,862 - 1,189 = 0,673$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,673}{3(3-1)}} = 0,335$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,630}{0,335} = 1,882$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (2)}$  yaitu  $1,882 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:  
 sehingga, persentase spermatozoa yang kapasitasasi hasil sexing dengan menggunakan Andromed  
 pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah.

D. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Kapasitasasi Menggunakan Pengencer CEP-2  
 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Spermatozoa yang kapasitasasi CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	3,833	3,340	0,493	0,243
9	2,851	2,677	0,174	0,030
10	3,382	2,694	0,688	0,473
$\Sigma$	10,065	8,711	1,354	0,746
$\bar{X}$	3,355	2,904	0,451	0,249

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 0,746 - \frac{(1,354)^2}{3} = 0,746 - 0,611 = 0,135$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,135}{3(3-1)}} = 0,150$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,451}{0,150} = 3,015$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (2)}$  yaitu  $3,015 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:  
 sehingga, persentase spermatozoa yang kapasitasasi hasil sexing dengan menggunakan CEP-  
 2 ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan  
 bawah

**Lampiran 12. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Reaksi Akrosom Sesudah Sexing Menggunakan Gradien Albumin (Putih Telur)**

Tabel 12. Persentase spermatozoa yang reaksi akrosom sesudah sexing

Ulangan	Pengencer Andromed		Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%	
	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)	Lap. Atas (%)	Lap. Bawah (%)
8	6,80	4,10	7,43	7,38
9	5,03	8,21	5,08	3,70
10	4,38	4,02	3,91	2,70
Rata-rata	5,40	5,44	5,47	4,59
SD	1,25	2,39	1,80	2,46

Data menyebar antara 2,70%-8,21% sehingga perlu dilakukan transformasi akar kuadrat (Sastrosupadi, 2000).

Tabel Hasil Transformasi Akar Kuadrat Persentase Spermatozoa yang Reaksi Akrosom

Ulangan	Andromed		CEP-2	
	Lap. Atas	Lap. Bawah	Lap. Atas	Lap. Bawah
8	2,70	2,15	2,82	2,81
9	2,35	2,95	2,36	2,05
10	2,21	2,13	2,10	1,79
Jumlah	7,26	7,22	7,28	6,65
Rata-rata	2,42	2,41	2,43	2,22

**A. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Reaksi Akrosom Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas**

Ulangan	Spermatozoa yang reaksi akrosom lapisan atas		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	2,702	2,816	-0,114	0,013
9	2,352	2,363	-0,011	0,0001
10	2,209	2,099	0,110	0,012
Σ	7,263	7,279	-0,016	0,025
$\bar{X}$	2,421	2,426	-0,005	0,008

$$SS_D = \sum d^2 - \frac{(\sum d)^2}{n} = 0,025 - \frac{(-0,016)^2}{3} = 0,025 - 8,53E-05 = 0,0249$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SS_D}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,0249}{3(3-1)}} = 0,064$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{S_D} = \frac{-0,005}{0,064} = -0,077$$

$$t_{0,05(2)} = 4,303$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05(2)}$  yaitu  $0,078 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:

sehingga, persentase spermatozoa yang reaksi akrosom hasil sexing pada lapisan atas dengan menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan menggunakan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

B. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Reaksi Akrosom Menggunakan Pengencer Andromed dan CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Bawah

Ulangan	Spermatozoa yang reaksi akrosom lapisan bawah		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Andromed (A)	CEP-2 (B)		
8	2,145	2,807	-0,661	0,437
9	2,951	2,050	0,901	0,811
10	2,127	1,790	0,337	0,114
Σ	7,223	6,647	0,577	1,362
$\bar{X}$	2,408	2,216	0,192	0,454

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 1,362 - \frac{(0,577)^2}{3} = 1,362 - 0,1109 = 1,251$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{1,251}{3(3-1)}} = 0,457$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,192}{0,457} = 0,420$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{\text{hitung}} < t_{0,05 (3)}$  yaitu  $0,420 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima: sehingga, persentase spermatozoa yang reaksi akrosom hasil sexing pada lapisan bawah dengan menggunakan pengencer Andromed sama atau tidak berbeda dengan pengencer CEP-2 ditambah kuning telur 10%.

C. Uji T Berpasangan Spermatozoa yang Reaksi Akrosom Menggunakan Pengencer Andromed pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Spermatozoa yang reaksi akrosom Andromed		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	2,702	2,145	0,557	0,310
9	2,352	2,951	-0,599	0,359
10	2,209	2,127	0,082	0,007
Σ	7,263	7,223	0,040	0,676
$\bar{X}$	2,421	2,408	0,013	0,225

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 0,676 - \frac{(0,040)^2}{3} = 0,676 - 0,0005 = 0,675$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,675}{3(3-1)}} = 0,336$$

$$t_{\text{hitung}} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,013}{0,336} = 0,039$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (2)}$  yaitu  $0,039 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:  
sehingga, persentase spermatozoa yang reaksi akrosom hasil sexing dengan menggunakan Andromed pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

D. Uji T Berpasangan Persentase Spermatozoa yang Reaksi Akrosom Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10% pada Lapisan Atas dan Bawah

Ulangan	Spermatozoa yang reaksi akrosom CEP-2		A-B=d	d <sup>2</sup>
	Lap. Atas (A)	Lap. Bawah (B)		
8	2,816	2,807	0,010	0,0001
9	2,363	2,050	0,313	0,098
10	2,099	1,790	0,309	0,096
$\Sigma$	7,279	6,647	0,632	0,194
X	2,426	2,216	0,211	0,065

$$SS_D = \Sigma d^2 - \frac{(\Sigma d)^2}{n} = 0,194 - \frac{(0,632)^2}{3} = 0,194 - 0,133 = 0,061$$

$$S_D = \sqrt{\frac{SSD}{n(n-1)}} = \sqrt{\frac{0,061}{3(3-1)}} = 0,101$$

$$t_{hitung} = \frac{\text{rata-rata } d}{SD} = \frac{0,211}{0,101} = 2,094$$

$$t_{0,05 (2)} = 4,303$$

$t_{hitung} < t_{0,05 (2)}$  yaitu  $2,094 < 4,303$  maka hipotesis  $H_0$  diterima:  
sehingga, persentase spermatozoa yang reaksi akrosom hasil sexing dengan menggunakan CEP-2 ditambah kuning telur 10% ditambah kuning telur 10% pada lapisan atas sama atau tidak berbeda dengan lapisan bawah

**Lampiran 13. Hasil Analisa Regresi Korelasi Antara Persentase Motilitas dengan Persentase Spermatozoa Belum Kapasitasi pada Lapisan Atas dan Lapisan Bawah**

**A. Sexing Menggunakan Pengencer Andromed**

**Correlations**

		BK	Motilitas
Pearson Correlation	BK	1.000	-.808
	Motilitas	-.808	1.000
Sig. (1-tailed)	BK	.	.026
	Motilitas	.026	.
N	BK	6	6
	Motilitas	6	6

**Model Summary(b)**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.808(a)	.653	.566	.08009

a Predictors: (Constant), Motilitas

b Dependent Variable: BK

**ANOVA(b)**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.048	1	.048	7.517	.052(a)
	Residual	.026	4	.006		
	Total	.074	5			

a Predictors: (Constant), Motilitas

b Dependent Variable: BK

**Coefficients(a)**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	10.345	.394		26.249	.000
	Motilitas	-.019	.007	-.808	-2.742	.052

a Dependent Variable: BK

B. Sexing Menggunakan Pengencer CEP-2 Ditambah Kuning Telur 10%

**Correlations**

		BK	Motilitas
Pearson Correlation	BK	1.000	-.008
	Motilitas	-.008	1.000
Sig. (1-tailed)	BK	.	.494
	Motilitas	.494	.
N	BK	6	6
	Motilitas	6	6

**Model Summary(b)**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.008(a)	.000	-.250	.28266

a Predictors: (Constant), Motilitas

b Dependent Variable: BK

**ANOVA(b)**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.000	1	.000	.000	.989(a)
	Residual	.320	4	.080		
	Total	.320	5			

a Predictors: (Constant), Motilitas

b Dependent Variable: BK

**Coefficients(a)**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	9.291	1.391		6.680	.003
	Motilitas	.000	.024	-.008	-.015	.989

a Dependent Variable: BK